



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ :</p> <p>C12N 15/74, 15/31, C07K 14/35, A61K 48/00, 39/04, C07K 19/00, C12Q 1/68, C07K 16/12, G01N 33/50, 33/53 // C12N 15/52, 15/65</p>	A2	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/09186</p> <p>(43) Date de publication internationale: 25 février 1999 (25.02.99)</p>					
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01813</p> <p>(22) Date de dépôt international: 14 août 1998 (14.08.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:</p> <table border="0"> <tr> <td>97/10404</td> <td>14 août 1997 (14.08.97)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>97/11325</td> <td>11 septembre 1997 (11.09.97)</td> <td>FR</td> </tr> </table> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GICQUEL, Brigitte [FR/FR]; 8, rue Daguerre, F-75014 Paris (FR). PORTNOÏ, Denis [FR/FR]; 7, rue Simon Lefranc, F-75004 Paris (FR). LIM, Eng-Mong [KH/FR]; 20, rue Georges Pitard, F-75015 Paris (FR). PELICIC, Vladimir [FR/FR]; 28, rue de Chateaudun, F-75009 Paris (FR). GUIGUENO, Agnès [FR/FR]; 26-28, rue Gambetta, F-62026 Arras (FR). GOGUET DE LA SALMONIERE, Yves [FR/FR]; 30, rue Lourmel, F-75015 Paris (FR).</p>	97/10404	14 août 1997 (14.08.97)	FR	97/11325	11 septembre 1997 (11.09.97)	FR	<p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée</p> <p><i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p> <p><i>Avec une indication relative à du matériel biologique déposé, fournie selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description.</i></p>
97/10404	14 août 1997 (14.08.97)	FR					
97/11325	11 septembre 1997 (11.09.97)	FR					
<p>(54) Title: POLYPEPTIDE NUCLEIC SEQUENCES EXPORTED FROM MYCOBACTERIA, VECTORS COMPRISING SAME AND USES FOR DIAGNOSING AND PREVENTING TUBERCULOSIS</p>							
<p>(54) Titre: SEQUENCES NUCLEIQUES DE POLYPEPTIDES EXPORTES DE MYCOBACTERIES, VECTEURS LES COMPRENANT ET APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC ET A LA PREVENTION DE LA TUBERCULOSE</p>							
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns recombinant vectors replicated in mycobacteria, a set of sequences coding for exported polypeptides detected by fusion with alkaline phosphatase, in particular one polypeptide, called DP428, of about 12 kD corresponding to an exported protein found in mycobacteria belonging to the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex. The invention also concerns methods and kits for detecting in vitro the presence of a mycobacterium and in particular a mycobacterium belonging to the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex in a biological sample using said polypeptides, their fragments or polynucleotides coding for the latter. The invention also concerns immunogenic or vaccine compositions for preventing and/or treating infections caused by mycobacteria and in particular a mycobacterium belonging to said complex, particularly tuberculosis.</p>							
<p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet des vecteurs recombinants se répliquant chez les mycobactéries, un ensemble de séquences codant pour des polypeptides exportés détectés par des fusions avec la phosphatase alcaline, notamment un polypeptide, dénommé DP428, d'environ 12kD correspondant à une protéine exportée retrouvée dans les mycobactéries appartenant au complexe de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>. L'invention concerne également des procédés et des kits de détection <i>in vitro</i> de la présence d'une mycobactérie et en particulier une mycobactérie appartenant au complexe de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dans un échantillon biologique utilisant lesdits polypeptides, leurs fragments ou des polynucléotides codant pour ces derniers. L'invention vise des compositions immunogènes ou vaccins pour la prévention et/ou le traitement d'infections provoquées par des mycobactéries et en particulier une mycobactérie appartenant audit complexe, en particulier la tuberculose.</p>							

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LJ	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Séquences nucléiques de polypeptides exportés de mycobactéries, vecteurs les comprenant et applications au diagnostic et à la prévention de la tuberculose.

5 L'invention a pour objet de nouveaux vecteurs recombinants de criblage, de clonage et/ou d'expression se répliquant chez les mycobactéries. Elle a également pour objet un ensemble de séquences codant pour des polypeptides exportés détectés par des fusions avec la phosphatase
10 alcaline et dont l'expression est régulée (induite ou réprimée) ou constitutive lors de l'ingestion des mycobactéries par les macrophages. L'invention concerne également un polypeptide, dénommé DP428, d'environ 12kD correspondant à une protéine exportée retrouvée dans les
15 mycobactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*. L'invention vise aussi un polynucléotide comprenant une séquence codant pour ce polypeptide. Elle concerne également l'utilisation du polypeptide ou de fragments de celui-ci et des polynucléotides codant pour
20 ces derniers (ou encore les polynucléotides complémentaires à ces derniers) pour la réalisation de moyens de détection in vitro, ou in vivo de la présence d'une mycobactérie appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique ou pour la détection de réactions
25 de l'hôte infecté par ces espèces bactériennes. L'invention vise enfin l'utilisation du polypeptide ou de fragments de celui-ci ainsi que des polynucléotides codant pour ces derniers en tant que moyens destinés à la préparation d'une composition immunogène, susceptible d'induire une réponse
30 immunitaire dirigée contre les mycobactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*, ou d'une composition vaccinale pour la prévention et/ou le traitement d'infections provoquées par des mycobactéries appartenant audit complexe, en particulier la tuberculose.

La présente invention a aussi pour but d'utiliser ces séquences (polypeptidiques et polynucléotidiques) comme
5 cible pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de la croissance et de la multiplication des mycobactéries et de leur maintien chez l'hôte, ses inhibiteurs pouvant servir d'antibiotiques.

10 Le genre *Mycobacterium*, qui comprend au moins 56 espèces différentes, inclut des pathogènes humains majeurs tels que *M. leprae* et *M. tuberculosis*, les agents responsables de la lèpre et de la tuberculose, qui restent des problèmes graves de santé publique dans le monde
15 entier.

La tuberculose continue d'être un problème de santé publique dans le monde. Aujourd'hui, cette maladie est la cause de 2 à 3 millions de morts dans le monde et environ 8
20 millions de nouveaux cas sont observés chaque année (Bouvet, 1994). Dans les pays développés *M. tuberculosis* est la cause la plus commune des infections mycobactériennes. En France il apparaît environ 10 000 nouveaux cas par an et parmi les maladies à déclaration
25 obligatoire c'est la tuberculose qui comprend le plus grand nombre de cas. La vaccination par le BCG (Bacille de Calmette et Guérin), une souche avirulente dérivée de *M. bovis* et qui est très utilisée comme vaccin contre la tuberculose, est loin d'être efficace au sein de toutes les
30 populations. Cette efficacité varie environ de 80 % dans les pays occidentaux comme l'Angleterre, à 0 % en Inde (résultats du dernier essai de vaccination à Chingleput., publiés en 1972 dans *Indian J. Med. Res.*). De plus, l'apparition de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux
35 antituberculeux et le risque accru chez les patients immunodéprimés, patients atteints du SIDA, de développer

une tuberculose, rendent nécessaire la mise au point de méthodes rapides, spécifiques et fiables pour le diagnostic de la tuberculose et la mise au point de nouveaux vaccins. Par exemple, une étude épidémiologique réalisée en Floride, et dont les résultats ont été publiés en 1993 dans AIDS thérapies, a montré que 10 % des malades atteints de SIDA sont atteints de tuberculose au moment du diagnostic du SIDA ou 18 mois avant celui-ci. Chez ces malades, la tuberculose apparaît dans 60 % des cas sous une forme disséminée donc non repérable par les critères de diagnostic classiques comme la radiographie pulmonaire ou l'analyse de crachats.

Actuellement, une certitude sur le diagnostic apporté par la mise en évidence de bacilles cultivables dans un prélèvement provenant du malade n'est obtenue que pour moins de la moitié des cas de tuberculose, même dans les cas de tuberculose pulmonaire. Le diagnostic de la tuberculose et des autres mycobactéries apparentées est donc difficile à réaliser, et cela pour différentes raisons : les mycobactéries sont souvent présentes en faible quantité, leur temps de génération est très long (24h pour *M. tuberculosis*) et leur culture est difficile. (Bates et al., 1986).

D'autres techniques sont utilisables en clinique, pour identifier une infection mycobactérienne :

a) L'identification directe des microorganismes au microscope ; cette technique est rapide, mais ne permet pas l'identification de l'espèce mycobactérienne observée et manque de sensibilité (Bates, 1979).

Les cultures, lorsqu'elles sont positives, ont une spécificité approchant 100 % et permettent l'identification de l'espèce mycobactérienne isolée ; néanmoins, comme précisé ci-dessus, la croissance des mycobactéries *in vitro* est longue (ne peut être réalisée qu'en 3 à 6 semaines de

cultures répétées (Bates, 1979 ; Bates et al., 1986)) et coûteuse.

b) Les techniques sérologiques peuvent s'avérer utiles dans certaines conditions, mais leur utilisation est parfois limitée par leur sensibilité et/ou leur spécificité faibles (Daniel et al., 1987).

c) La présence de mycobactéries au sein d'un échantillon biologique peut aussi être déterminée par hybridation moléculaire avec de l'ADN ou de l'ARN en utilisant des sondes d'oligonucléotides spécifiques des séquences recherchées (Kiehn et al., 1987 ; Roberts et al., 1987 ; Drake et al., 1987). Plusieurs études ont montré l'intérêt de cette technique pour le diagnostic des infections à mycobactéries. Les sondes utilisées sont constituées d'ADN, d'ARN ribosomique ou de fragments d'ADN mycobactériens provenant de banque de gènes. Le principe de ces techniques repose sur le polymorphisme des séquences nucléotidiques des fragments utilisés ou sur le polymorphisme des régions avoisinantes. Dans tous les cas, elles nécessitent l'utilisation de cultures et ne sont pas applicables directement sur les échantillons biologiques.

La faible quantité de mycobactéries présentes au sein d'un échantillon biologique et en conséquence la quantité faible d'ADN cible à détecter dans cet échantillon peut nécessiter le recours à une amplification spécifique *in vitro* de l'ADN cible avant sa détection à l'aide de la sonde nucléotidique et en utilisant des techniques d'amplification *in vitro* telles que la PCR (amplification en chaîne à la polymérase. L'amplification spécifique de l'ADN par la technique PCR peut constituer la première étape d'un procédé de détection de la présence d'un ADN mycobactérien dans un échantillon biologique, la détection proprement dite de l'ADN amplifié étant effectuée dans un

second temps à l'aide d'une sonde oligonucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement à l'ADN amplifié.

Un test de détection de mycobactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*, par hybridation sandwich (test utilisant une sonde de capture et une sonde de détection) a été décrit par Chevrier et al. en 1993. le complexe de *Mycobacterium tuberculosis* est un groupe de mycobactéries qui comprend *M. bovis*-BCG, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. microti*.

Un procédé de détection de faibles quantités de mycobactéries, appartenant au complexe tuberculosis, par amplification génique et hybridation directement sur des échantillons biologiques a été mis au point. Ledit procédé utilise la séquence d'insertion IS6110 (Brevet européen EP 0 490 951 B1). Thierry et al. ont décrit en 1990 une séquence spécifique du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et nommée IS 6110. Certains auteurs ont proposé d'amplifier spécifiquement l'ADN provenant de *Mycobacterium* en utilisant des amorces nucléiques dans une méthode d'amplification, telle que la réaction de polymérase en chaîne (PCR). Patel et al. ont décrit en 1990 l'utilisation de plusieurs amorces nucléiques choisies à partir d'une séquence connue en tant que sonde dans l'identification de *M. tuberculosis*. Cependant, la longueur des fragments obtenus en utilisant ces amorces était différente de la longueur théorique attendue et plusieurs fragments de taille variable étaient obtenus. De plus, les auteurs ont observé l'absence d'hybridation des produits amplifiés avec le plasmide ayant servi à déterminer les amorces. Ces résultats indiquent que ces amorces ne seraient pas appropriées dans la détection de la présence de *M. tuberculosis* dans un échantillon biologique et confirment la nature critique du choix des amorces. La même année, J.L. Guesdon et D. Thierry ont décrit une méthode de

détection de *M. tuberculosis*, de grande sensibilité, par amplification d'un fragment d'ADN de *M. tuberculosis* localisé au sein de la séquence IS6110 (Brevet européen EP 461 045) à l'aide d'amorces générant des fragments d'ADN amplifié de longueur constante, même lorsque le choix des amorces conduisait à l'amplification de fragments longs (de l'ordre de 1000 à 1500 bases) où le risque d'interruption de la polymérisation est élevée en raison des effets de la structure secondaire de la séquence. D'autres amorces spécifiques de la séquence IS6110 sont décrites dans le brevet européen N° EP-0490 951.

Les inventeurs ont montré (résultats non publiés) que certains isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* étaient exempts de la séquence d'insertion IS6110 et ne pouvaient donc être détectés à l'aide des oligonucléotides spécifiques de cette séquence pouvant conduire ainsi à des résultats de diagnostic faussement négatifs. Ces résultats confirment une observation similaire faite par Yuen et al. en 1993. L'impossibilité de détecter ces souches pathogènes potentiellement présentes dans un échantillon biologique prélevé sur un patient est ainsi susceptible de conduire à des difficultés voire des erreurs de diagnostic. La disponibilité de plusieurs séquences spécifiques du Bacille de la tuberculose, à l'intérieur desquelles des amorces appropriées pour l'amplification seront choisis, est importante. La séquence DP428 décrite ici pourra être utilisée.

M. bovis et *M. tuberculosis*, les agents causals de la tuberculose, sont des bactéries facultatives intracellulaires.

Ces agents ont développé des mécanismes pour assurer leur survie et leur répllication à l'intérieur du macrophage, un des types cellulaires qui est supposé

éradiquer l'invasion par des microorganismes. Ces agents sont capables de moduler l'évolution normale de leur phagosome et de les empêcher de se différencier en un compartiment acide riche en hydrolase (Clemens, 1979 ;
5 Clemens et al., 1996; Sturgill-Koszycki et al., 1994 et Xu et al., 1994). Cependant, cette modulation n'est possible que si la bactérie est vivante au sein du phagosome, suggérant que des composés synthétisés de manière active et/ou sécrétés à l'intérieur de la cellule font partie de
10 ce mécanisme. Des protéines exportées sont probablement impliquées dans ce mécanisme. En dépit des problèmes majeurs de santé liés à ces organismes pathogènes, on sait peu de choses sur leurs protéines exportées et/ou sécrétées. Des analyses en SDS-PAGE de filtrat de culture
15 de *M. tuberculosis* montrent au moins 30 protéines sécrétées (Altschul et al., 1990 ; Nagal et al., 1991 et Young et al., 1992). Certaines d'entre elles ont été caractérisées, leurs gènes clonés et séquencés (Borremans et al., 1989 ; Wiker et al., 1992 et Yamaguchi et al., 1989). D'autres,
20 bien qu'il s'agisse d'antigènes immunodominants d'importance majeure pour induire une immunité protectrice (Anderson et al., 1991 et Orme et al., 1993), ne sont pas totalement identifiés. En outre, il est probable que de nombreuses protéines exportées restent fixées sur la
25 membrane cellulaire et par conséquent ne soient pas présentes dans les surnageants de culture. Il a été montré que les protéines localisées à la surface externe de diverses bactéries pathogènes, telles que l'invasine de 103 kDa de *Yersinia pseudotuberculosis* (Isberg et al., 1987) ou
30 l'internaline de 80 kDa de *Listeria monocytogenes* (Gaillard et al., 1991 et Dramsi et al., 1997) jouent un rôle important dans les interactions avec les cellules hôtes et par conséquent, dans la pathogénicité comme dans l'induction de réponses protectrices. Ainsi, une protéine
35 liée à la membrane pourrait être importante pour l'infection à *M. tuberculosis* comme pour l'induction de

réponse protectrice contre cette infection. Ces protéines pourraient revêtir un intérêt certain pour la préparation de vaccins.

5 Récemment, il a été décrit l'adaptation aux mycobactéries d'une méthodologie génétique pour l'identification et la sélection phénotypique de protéines exportées (Lim et al., 1995). Cette méthode utilise la phosphatase alcaline (PhoA) périplasmique d'*E. coli*. Un
10 vecteur plasmidique a été construit permettant la fusion de gènes entre un gène *PhoA* tronqué et des gènes codant pour des protéines exportées (Manoil et al., 1990).

 Par cette méthode, il a pu être identifié un gène
15 de *M. tuberculosis* (*erp* (Berthet et al., 1995)) présentant des homologues avec une protéine exportée de 28 kDa de *M. leprae*, qui est une cible fréquente des réponses humores de la forme lépromateuse de la lèpre. Une protéine présentant des motifs aminoacides caractéristiques de la
20 désaturase de plante (*des*) a aussi été caractérisée par la technique de fusion avec *PhoA*.

 Cependant, cette méthode génétique d'identification de protéines exportées ne permet pas d'évaluer facilement
25 l'expression intracellulaire des gènes correspondants. Une telle évaluation est d'une importance primordiale à la fois pour la sélection de bons candidats vaccins et pour la compréhension des interactions entre les bactéries et leurs cellules hôtes. L'induction de l'expression de facteur de
30 virulence par contact de cellule cible pathogène a été décrite. C'est le cas par exemple pour les facteurs de virulence Yops (Petersson et al., 1996) de *Yersinia pseudotuberculosis*. *Shigella* par contact avec les cellules cibles relargue les protéines *Ipa* dans le milieu de
35 culture, et *Salmonella* synthétise de nouvelles structures

de surface.

Compte tenu de ce qui précède, il existe aujourd'hui un grand besoin de développer de nouveaux vaccins contre les mycobactéries pathogènes ainsi que de nouveaux tests de diagnostic spécifiques, fiables et rapides. Ces développements nécessitent la mise au point d'outils spécifiques encore plus performants permettant, d'une part, d'isoler ou d'obtenir des séquences de nouveaux polypeptides spécifiques, notamment immunogènes, et, d'autre part, de mieux comprendre le mécanisme des interactions entre les bactéries et leurs cellules hôtes comme notamment l'induction de l'expression de facteur de virulence. Ceci est précisément l'objet de la présente invention.

Les inventeurs ont défini et réalisé dans ce but de nouveaux vecteurs permettant le criblage, le clonage et/ou l'expression de séquences d'ADN de mycobactéries afin d'identifier parmi ces séquences, des acides nucléiques codant pour des protéines d'intérêt, de préférence des protéines exportées, pouvant être localisées sur la membrane bactérienne et/ou sécrétées, et d'identifier parmi ces séquences celles qui sont induites ou réprimées lors de l'infection (croissance intracellulaire).

Description

La présente invention décrit l'utilisation du gène rapporteur *phoA* chez les mycobactéries. Il permet d'identifier des systèmes d'expression et d'exportation dans un contexte mycobactérien. Beaucoup de gènes ne sont exprimés que dans un tel contexte, ce qui montre l'avantage de la présente invention. Au cours du clonage de segments d'ADN de souches du complexe *M. Tuberculosis* en fusion avec *phoA* dans une autre mycobactérie comme *M. smegmatis*, le

début du gène, ses régions régulatrices et son régulateur seront clonés ce qui permettra d'observer une régulation. Si cette régulation est positive, le clonage du régulateur constituera un avantage pour observer l'expression et
5 l'exportation.

Dans le contexte de l'invention, on entend par mycobactérie toutes les mycobactéries appartenant aux diverses espèces énumérées par Wayne L. G. and Kubica G. P.
10 (1980). Family Mycobacteriaceae in Bergey's manual of systematic bacteriology, J. P. Butler Ed. (Baltimore USA : Williams et Wilkins P. 1436-1457).

Dans certains cas les gènes clonés sont soumis dans
15 leur hôte d'origine à une régulation négative rendant l'observation de l'expression et de l'exportation difficile chez l'hôte d'origine. Dans ce cas, le clonage du gène en absence de son régulateur négatif, dans un hôte ne le contenant pas, constituera un avantage.

20

L'invention vise aussi de nouveaux polypeptides et de nouveaux polynucléotides de mycobactéries ayant pu être isolés au moyen des vecteurs précédents et susceptibles d'entrer dans la réalisation de compositions pour la
25 détection d'une infection par des mycobactéries, ou pour la protection contre une infection due à des mycobactéries ou pour la recherche d'inhibiteurs comme cela est décrit précédemment pour DP428.

30

L'invention a donc pour objet un vecteur recombinant de criblage, de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il se réplique chez des mycobactéries et en ce qu'il contient :

35

- 1) un réplicon fonctionnel chez les mycobactéries ;
- 2) un marqueur de sélection ;

3) une cassette rapporteur comprenant :

- a) un site de clonage multiple (polylinker),
- b) éventuellement un terminateur de transcription
5 actif chez les mycobactéries, en amont du polylinker,
- c) une séquence nucléotidique codante issue d'un gène
codant pour un marqueur d'expression, d'exportation et/ou
de sécrétion de protéine, ladite séquence nucléotidique
étant dépourvue de son codon d'initiation et de ses
10 séquences de régulation, et
- d) une séquence nucléotidique codante issue d'un gène
codant pour un marqueur d'activité de promoteurs contenus
dans le même fragment, ladite séquence nucléotidique étant
pourvue de son codon d'initiation. Eventuellement, le
15 vecteur recombinant contient également un réplicon
fonctionnel chez E. coli.

De manière préférée, le marqueur d'exportation et/ou
de sécrétion est placé dans la même orientation que le
20 marqueur d'activité de promoteurs.

Préférentiellement, le vecteur recombinant de criblage
selon l'invention comprendra, en outre, un terminateur de
transcription placé en aval du marqueur d'activité de
25 promoteurs, ce qui est de nature à permettre l'obtention de
transcrits courts qui se révèlent plus stables et qui, par
conséquent, permettent un plus haut niveau d'expression des
produits de traduction.

30 Le marqueur d'exportation et/ou de sécrétion est une
séquence de nucléotides dont l'expression suivie de
l'exportation et/ou de la sécrétion dépend des éléments de
régulation qui contrôlent son expression.

35 Par "séquences ou éléments de régulation de
l'expression de la production de polypeptides et de sa
localisation", on entend une séquence promotrice de la

transcription, une séquence comprenant le site de liaison au ribosome (RBS), les séquences responsables de l'exportation et/ou la sécrétion telles que la séquence dite séquence signal.

5

Un premier marqueur intéressant d'exportation et/ou d'expression est une séquence codante issue du gène *phoA*. Le cas échéant, elle est tronquée de telle façon que l'activité phosphatase alcaline est cependant susceptible d'être restaurée lorsque la séquence codante tronquée est placée sous le contrôle d'un promoteur et d'éléments de régulation appropriés.

10

D'autres marqueurs d'exposition, d'exportation et/ou de sécrétion peuvent être utilisés. On citera à titre d'exemples une séquence du gène β -agarase, de la nucléase d'un staphylocoque ou d'une β -lactamase.

15

Parmi les marqueurs intéressants d'activité de promoteurs contenus dans le même fragment, on préfère une séquence codante issue du gène *luc* de luciférase de luciole pourvue de son codon d'initiation.

20

D'autres marqueurs d'activité de promoteurs contenus dans le même fragment peuvent être utilisés. On citera à titre d'exemples une séquence du gène de la GFP (Green Fluorescent Protein).

25

Le terminateur de transcription doit être fonctionnel chez les mycobactéries. Un terminateur avantageux est à cet égard le terminateur du coliphage T4 (tT4). D'autres terminateurs appropriés pour la réalisation de l'invention peuvent être isolés en utilisant la technique présentée dans les exemples, par exemple au moyen d'une cassette "omega" (Prentki et al., 1984).

30

35

Un vecteur particulièrement préféré pour la réalisation de l'invention est un plasmide choisi parmi les plasmides suivants déposés à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue de Docteur Roux, 5 75724 Paris cedex 15, France) :

a) pJVEDa déposé à la CNCM sous le N° I-1797, le 12/12 1996,

b) pJVEDb déposé à la CNCM sous le N° I-1906, le 25 10 juillet 1997,

c) pJVEDc déposé à la CNCM sous le N° I-1799 , le 12/12 1996.

Pour la sélection, ou l'identification de séquences 15 d'acides nucléiques de mycobactéries codant pour des polypeptides susceptibles d'être incorporés dans des compositions immunogènes, ou antigéniques pour la détection d'une infection, ou susceptibles d'induire ou de réprimer un facteur de virulence de mycobactéries, le vecteur de 20 l'invention comprendra, en l'un des sites de clonage multiple du polylinker, une séquence de nucléotides d'une mycobactérie chez laquelle on détecte la présence de séquences correspondant à des polypeptides exportés et/ou sécrétés pouvant être induits ou réprimés lors de 25 l'infection, ou encore exprimés ou produits de façon constitutive, leurs séquences promotrices et/ou régulatrices associées susceptibles de permettre ou de favoriser l'exportation et/ou la sécrétion desdits polypeptides d'intérêt, ou tout ou partie de gènes 30 d'intérêt codant pour lesdits polypeptides.

De préférence, cette séquence est obtenue par fragmentation physique ou par digestion enzymatique de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire d'un ARN d'une 35 mycobactérie, de préférence *M. tuberculosis* ou choisie parmi *M. africanum*, *M. bovis*, *M. avium* ou *M. leprae*.

Les vecteurs de l'invention peuvent en effet également être utilisés pour déterminer la présence de séquences d'intérêt, de préférence correspondant à des protéines exportées et/ou sécrétées, et/ou capables d'être induites ou réprimées ou produites de façon constitutive lors de l'infection, notamment lors de la phagocytose par les macrophages, et selon ce qui a été exposé précédemment, chez des mycobactéries telles que *M. africanum*, *M. bovis*, *M. avium* ou *M. leprae* dont on aura traité l'ADN ou l'ADNC par fragmentation physique ou avec des enzymes déterminées.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention la digestion enzymatique de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire est effectuée à partir de *M. tuberculosis*.

De préférence cet ADN est digéré avec une enzyme telle que sau3A, BclI, BglII.

D'autres enzymes de digestion telles que ScaI, ApaI, SacII, KpnI ou encore des nucléases ou des polymérases, peuvent naturellement être mises en oeuvre, dès lors qu'elles permettent l'obtention de fragments dont les extrémités peuvent être insérées dans l'un des sites de clonage du polylinker du vecteur de l'invention.

Le cas échéant, des digestions avec différentes enzymes seront effectuées simultanément.

Des vecteurs recombinants préférés pour la réalisation de l'invention sont choisis parmi les vecteurs recombinants suivants déposés à la CNCM :

- a) p6D7 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1814,
- b) p5A3 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1815,
- c) p5F6 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1816,
- d) p2A29 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1817,

- e) pDP428 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1818,
f) p5B5 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1819,
5 g) p1C7 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1820,
h) p2D7 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1821,
10 i) p1B7 déposé le 31 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1843,
j) pJVED/*M. tuberculosis* déposé le 25 juillet 1997 à la CNCM sous le N° I-1907,
k) pM1C25 déposé le 4 août 1998 à la CNCM sous le n°I-2062.

15

Parmi les plus préférés, on préfère le vecteur recombinant pDP428 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1818, et le vecteur pM1C25 déposé le 4 août 1998 à la CNCM sous le N° I-2062.

20

L'invention à également pour objet un procédé de criblage de séquences de nucléotides issues de mycobactéries pour déterminer la présence de séquences correspondant à des polypeptides exportés et/ou sécrétés
25 pouvant être induits ou réprimés lors de l'infection, leurs séquences promotrices et/ou régulatrices associées susceptibles notamment de permettre ou de favoriser l'exportation et/ou la sécrétion desdits polypeptides d'intérêt, ou tout ou partie de gènes d'intérêt codant pour
30 lesdits polypeptides, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur recombinant selon l'invention.

L'invention concerne aussi un procédé de criblage, selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

35

- a) la fragmentation physique des séquences d'ADN de mycobactéries ou leur digestion par au moins une enzyme

déterminée et la récupération des fragments obtenus ;

b) l'insertion des fragments obtenus à l'étape a) dans un site de clonage, compatible le cas échéant avec l'enzyme de l'étape a), du polylinker d'un vecteur selon l'invention ;

c) si besoin, l'amplification desdits fragments contenus dans le vecteur, par exemple par répllication de ce dernier après insertion du vecteur ainsi modifié dans une cellule déterminée, de préférence *E coli* ;

10 d) la transformation des cellules hôtes par le vecteur amplifié à l'étape c), ou en l'absence d'amplification, par le vecteur de l'étape b) ;

e) la culture des cellules hôtes transformées dans un milieu permettant la mise en évidence du marqueur d'exportation et/ou de sécrétion, et /ou du marqueur d'activité de promoteurs contenu dans le vecteur ;

f) la détection des cellules hôtes positives (colonies positives) pour l'expression du marqueur d'exportation et/ou de sécrétion, et /ou du marqueur d'activité de promoteurs ;

20 g) l'isolement de l'ADN des colonies positives et l'insertion de cet ADN dans une cellule identique à celle de l'étape c) ;

h) la sélection des insertions contenues dans le vecteur, permettant l'obtention de clones positifs pour le marqueur d'exportation et/ou de sécrétion, et /ou pour le marqueur d'activité de promoteurs ;

i) l'isolement et la caractérisation des fragments d'ADN de mycobactéries contenues dans ces insérats.

30

Dans l'un des modes de réalisation préférés du procédé de criblage selon l'invention, les cellules hôtes positives, détectées à l'étape f), pour le marqueur d'exportation et/ou de sécrétion sont, éventuellement dans un second temps, testées pour la capacité de l'insert nucléotidique sélectionné à stimuler l'expression du

marqueur d'activité de promoteurs lorsque lesdites cellules hôtes sont phagocytées par des cellules du type macrophagique.

- 5 De manière plus spécifique, on compare la stimulation de l'expression du marqueur d'activité de promoteurs chez des cellules hôtes placées en culture axénique (cellules hôtes seules en culture) à la stimulation de l'expression du marqueur d'activité de promoteurs chez des cellules
10 hôtes cultivées en présence de macrophages et ainsi phagocytées par ces derniers.

- La sélection de cellules hôtes positives pour le marqueur d'activité de promoteurs peut être réalisée dès
15 l'étape e) du procédé de criblage décrit ci-dessus, ou encore après l'une quelconque des étapes f), g), h) ou i), c'est-à-dire une fois que les cellules hôtes ont été sélectionnées positivement pour le marqueur d'exportation et/ou de sélection.

20

- La mise en oeuvre de ce procédé permet la construction de banques d'ADN comportant des séquences correspondant à des polypeptides susceptibles d'être exportés et/ou
25 sécrétés, et/ou susceptibles d'être induits ou réprimés lors de l'infection lorsqu'ils sont produits au sein de mycobactéries recombinantes. L'étape i) du procédé peut comprendre une étape de séquençage des insertions sélectionnées.

- 30 De préférence, dans le procédé selon l'invention, le vecteur utilisé est choisi parmi les plasmides pJVEDa (CNCM, N° I-1797), pJVEDb (CNCM, N° I-1906), pJVEDc (CNCM, N° I-1799) ou pJVED/M. tuberculosis (CNCM, N° I-1907), et la digestion des séquences d'ADN de mycobactéries est
35 effectuée au moyen de l'enzyme Sau3A.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention,

le procédé de criblage est caractérisé en ce que les séquences de mycobactéries sont issues d'une mycobactérie pathogène, par exemple de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. africanum* ou *M. leprae*.

5

L'invention comprend également une banque d'ADN génomique ou d'ADNc complémentaire d'ARNm de mycobactérie, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par un procédé comprenant les étapes a) et b), ou a), b) et c) du procédé
10 précédent selon l'invention, de préférence une banque d'ADN génomique ou d'ADNc complémentaire d'ARNm de mycobactéries pathogènes, de préférence de mycobactéries appartenant au groupe du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, de préférence de *Mycobacterium tuberculosis*.

15

Dans la présente invention, on entend désigner par "séquences nucléiques" ou "séquences d'acides aminés" SEQ ID N° X à SEQ ID N° Y, où X et Y peuvent représenter indépendamment un nombre ou un caractère alphanumérique,
20 respectivement l'ensemble des séquences nucléiques ou l'ensemble des séquences d'acides aminés représentées par les figures X à Y, extrémités comprises.

Par exemple, les séquences nucléiques ou les séquences
25 d'acides aminés SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 4N sont respectivement les séquences nucléiques ou les séquences d'acides aminés représentées par les figures 1 à 4N, c'est-à-dire respectivement les séquences nucléiques ou les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 1A', SEQ
30 ID N° 1B', SEQ ID N° 1C', SEQ ID N° 1D, SEQ ID N° 1F, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3A, SEQ ID N° 3B, SEQ ID N° 3C, SEQ ID N° 4A, SEQ ID N° 4B, SEQ ID N° 4C, SEQ ID N° 4A', SEQ ID N° 4B', SEQ ID N° 4C', SEQ ID N° 4F, SEQ ID N° 4J, SEQ ID N° 4K, SEQ ID N° 4L, SEQ ID N° 4M et SEQ ID N° 4N.

35

L'invention a également pour objet les séquences

nucléotidiques de mycobactéries ou comprenant des séquences nucléotidiques de mycobactéries sélectionnées après la réalisation du procédé selon l'invention ci-dessus décrit.

5

De préférence, ladite mycobactérie est choisie parmi *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii* ou *M. xenopi*.

10

On préfère les séquences nucléotidiques de mycobactéries ou comprenant une séquence nucléotidique de mycobactérie, ladite séquence nucléotidique de mycobactérie étant choisie parmi les séquences de fragments d'ADN de mycobactérie de séquence nucléique SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 24C, SEQ ID N° 27A à SEQ ID N° 27C, SEQ ID N° 29 et SEQ ID N° 31A à SEQ ID N° 50F, respectivement représentées par les figures 1 à 24C (planches 1 à 150), par les figures 27A à 27C (planches 152 à 154), par la figure 29 (planche 156) et par les figures 31A à 50F (planches 158 à 275).

20

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, des séquences préférées sont par exemple les fragments d'ADN de mycobactéries de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3A, SEQ ID N°5A, SEQ ID N°6A, SEQ ID N°7A, SEQ ID N°8A, SEQ ID N°9A, SEQ ID N°10A, SEQ ID N°27A ou SEQ ID N°29 contenus respectivement dans les vecteurs pDP428 (CNCM, N°I-1818), p6D7 (CNCM, N°I-1814), p5F6 (CNCM, N°I-1816), p2A29 (CNCM, N°I-1817), p5B5 (CNCM, N°I-1819), p1C7 (CNCM, N°I-1820), p2D7 (CNCM, N°I-1821), p1B7 (CNCM, N°I-1843), p5A3 (CNCM, N°I-1815) et pM1C25 (CNCM, n°I-2062).

30

L'invention concerne également un acide nucléique comprenant la totalité de la phase de lecture ouverte d'une des séquences nucléotidiques selon l'invention, notamment une des séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 24C, SEQ ID N° 27A à SEQ ID N° 27C, SEQ ID N° 29 et SEQ ID N° 31A à SEQ ID N° 50F selon l'invention. Ledit acide nucléique peut être

35

isolé par exemple de la façon suivante :

- a) préparation d'une banque de cosmides à partir de l'ADN de *M. tuberculosis*, par exemple selon la technique décrite par Jacobs et al., 1991;
- b) hybridation de tout ou partie d'un acide nucléique sonde de séquence choisie par exemple parmi SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 24C, SEQ ID N° 27A à SEQ ID N° 27C, SEQ ID N° 29 et SEQ ID N° 31A à SEQ ID N° 50F avec les cosmides de la banque préalablement préparée à l'étape a) ;
- c) sélection des cosmides hybridant avec l'acide nucléique sonde de l'étape b) ;
- d) séquençage des inserts d'ADN des clones sélectionnés à l'étape c) et identification du cadre de lecture ouvert complet ;
- e) le cas échéant, clonage des inserts séquencés à l'étape d) dans un vecteur d'expression et/ou de clonage approprié.

Les acides nucléiques comprenant la totalité du cadre de lecture ouvert des séquences SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 24C, SEQ ID N° 27A à SEQ ID N° 27C, SEQ ID N° 29 et SEQ ID N° 31A à SEQ ID N° 50F sont parmi les acides nucléiques préférés.

25

La présente invention permet de déterminer un fragment de gène codant pour un polypeptide exporté. La comparaison avec la séquence du génome publiée par Cole et al. (Cole et al., 1998, Nature, 393, 537-544) permet de déterminer le gène en entier portant la séquence identifiée selon la présente invention.

30

Par séquence nucléotidique comprenant la totalité du cadre ouvert de lecture d'une séquence selon l'invention, on entend la séquence nucléotidique (génomique, ADNc, semi-synthétique ou synthétique) comprenant l'une des séquences

35

selon l'invention et s'étendant d'une part en 5' de ces séquences jusqu'au premier codon d'initiation de la traduction (ATG ou GTG) ou même jusqu'au premier codon stop, et d'autre part en 3' de ces séquences jusqu'au codon stop suivant, et ceci dans l'une quelconque des trois phases de lecture possibles.

Les séquences nucléotidiques complémentaires des séquences ci-dessus selon l'invention font également partie de l'invention.

Par polynucléotide de séquence complémentaire d'une séquence nucléotidique selon l'invention, on entend toute séquence d'ADN ou d'ARN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de ladite séquence selon l'invention et dont l'orientation est inversée.

Les fragments nucléotidiques des séquences ci-dessus selon l'invention notamment utiles en tant que sondes ou amorces font également partie de l'invention.

L'invention concerne aussi les polynucléotides caractérisés en ce qu'ils comprennent un polynucléotide choisi parmi :

- a) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire de la séquence d'un polynucléotide selon l'invention,
- b) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 50% d'identité avec un polynucléotide selon l'invention,
- c) un polynucléotide hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence de polynucléotide selon l'invention,
- d) un fragment d'au moins 8 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide défini selon l'invention.

Les conditions de forte stringence ainsi que le pourcentage d'identité seront définis ci-après dans la présente description.

Lorsque la séquence codante issue du gène marqueur d'exportation et/ou de sécrétion est une séquence issue du gène *phoA*, l'exportation et/ou la sécrétion du produit du gène *phoA*, le cas échéant tronqué, n'est obtenue que lorsque cette séquence est insérée en phase avec la séquence ou élément de régulation de l'expression de la production de polynucléotides et sa localisation placée en amont, qui contient les éléments contrôlant l'expression, l'exportation et/ou la sécrétion issus de séquence de mycobactéries.

Les vecteurs recombinants de l'invention peuvent bien entendu comprendre des sites de clonage multiples décalés de un ou deux nucléotides par rapport à un vecteur selon l'invention, permettant ainsi d'exprimer le polypeptide correspondant au fragment d'ADN de mycobactérie inséré et susceptible d'être traduit selon l'un des trois cadres de lecture possibles.

Par exemple les vecteurs préférés pJVEDb et pJVEDc de l'invention se distinguent du vecteur préféré pJVEDa par un décalage respectif de un et de deux nucléotides au niveau du site de clonage multiple.

Ainsi, les vecteurs de l'invention sont capables d'exprimer chacun des polypeptides susceptibles d'être codés par un fragment d'ADN de mycobactérie inséré. Cesdits polypeptides, caractérisés en ce qu'ils sont donc susceptibles d'être exportés et/ou sécrétés, et/ou induits ou réprimés, ou exprimés de façon constitutive lors de l'infection, font partie de l'invention.

On préfère notamment les polypeptides de l'invention dont les séquences d'acides aminés sont choisies parmi les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 24C, SEQ

ID N° 27A à SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 30 à SEQ ID N° 50F et représentées respectivement par les figures 1 à 24C (planches 1 à 150), les figures 27A à 28 (planches 152 à 155) et les figures 30 à 50F (planches 157 à 275).

5

Font également partie de l'invention, les fragments ou fragments biologiquement actifs ainsi que les polypeptides homologues desdits polypeptides. Fragment, fragment biologiquement actif et polypeptides homologue de polypeptide, étant tels que définis ci-après dans la description.

10

L'invention concerne également les polypeptides comprenant un polypeptide ou un de leurs fragments selon l'invention.

15

L'invention a aussi pour objet des mycobactéries recombinantes contenant un vecteur recombinant selon l'invention décrit précédemment. Une mycobactérie préférée est une mycobactérie du type *M. smegmatis*.

20

M. smegmatis permet avantageusement de tester l'efficacité de séquences de mycobactéries, pour le contrôle de l'expression, de l'exportation et/ou de la sécrétion, et/ou de l'activité de promoteurs d'une séquence donnée, par exemple d'une séquence codant pour un marqueur tel que la phosphatase alcaline et/ou la luciférase.

25

Une autre mycobactérie préférée est une mycobactérie du type *M. bovis*, par exemple la souche BCG utilisée actuellement pour la vaccination contre la tuberculose.

30

Une autre mycobactérie préférée est une souche de *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum* possédant potentiellement tous les systèmes de régulation appropriés.

35

Les inventeurs ont ainsi caractérisé en particulier un polynucléotide constitué par une séquence de nucléotides

présente chez toutes les souches testées de mycobactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*. Ce polynucléotide, dénommé DP428 contient un cadre ouvert de lecture (ORF) codant pour un polypeptide d'environ 12 kD.

5 Le cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour le polypeptide DP428 s'étend du nucléotide en position nt 941 au nucléotide en position nt 1351 de la séquence SEQ ID N° 2, le polypeptide DP428 ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N° 28 suivante :

10 MKTGTATRRRLAVLIALALPGAVALLAEPSATGASDPCAASEVARTVGSVAKSMGD
YLDSPETNQVMTAVLQQQVGPVSVASLKAHFEANPKVASDLHALSQPLTDLSTRCSLP
ISGLQAIGLMQAVQGARR.

15 Ce poids moléculaire (PM) correspond au PM théorique de la protéine mature obtenue après clivage de la séquence signal, le PM de la protéine ou polypeptide DP428 étant d'environ 10 kD après ancrage potentiel au peptidoglycane et coupure potentielle entre S et G du motif LPISG.

20 Ce polynucléotide inclut, d'une part, un cadre ouvert de lecture correspondant à un gène de structure et, d'autre part, les signaux de régulation de l'expression de la séquence codante en amont et en aval de cette dernière. Le polypeptide DP428 est composé d'un peptide signal, d'une
25 région centrale hydrophile et d'une région C-terminale hydrophobe. Cette dernière se termine par deux résidus arginines (R), signal de rétention, et est précédé par un motif LPISG qui rappelle le motif LPXTG d'ancrage au peptidoglycane (Schneewind et al., 1995).

30

Par gène de structure aux fins de la présente invention, on entend un polynucléotide codant pour une protéine, un polypeptide ou encore un fragment de ces derniers, ledit polynucléotide ne comprenant que la séquence correspondant
35 au cadre ouvert de lecture (ORF), ce qui exclut les séquences du côté 5' du cadre ouvert de lecture (ORF) qui dirigent l'initiation de la transcription.

Ainsi, l'invention concerne en particulier un polynucléotide dont la séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°2.

5

Plus particulièrement, l'invention concerne un polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi :

- 10 a) un polynucléotide dont la séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°2,
- b) un polynucléotide dont la séquence nucléique est la séquence comprise entre le nucléotide en position nt 964 et le nucléotide en position nt 1234, extrémités incluses,
- 15 de la séquence SEQ ID N°1,
- c) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire de la séquence d'un polynucléotide défini en a) ou b),
- d) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 50% d'identité avec un polynucléotide défini en a), b) ou c),
- 20 e) un polynucléotide hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence de polynucléotide défini en a), b), c) ou d),
- f) un fragment d'au moins 8 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide défini en a), b), c), d) ou e).

25

On entend par séquence nucléotidique, polynucléotide ou acide nucléique, selon la présente invention, aussi bien un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADN.

30

Par pourcentage d'identité au sens de la présente invention, on entend un pourcentage d'identité entre les bases de deux polynucléotides, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux polynucléotides étant réparties au hasard et sur toute leur longueur.

35

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux
5 fragments d'ADN complémentaires.

A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont
10 avantageusement les suivantes :

l'hybridation est réalisée à une température préférentielle de 65°C, en présence de tampon commercialisé sous le nom de rapid-hyb buffer par Amersham (RPN 1636) et 100 µg/ml d'ADN de E.coli.

15 Les étapes de lavage peuvent, par exemple, être les suivantes :

- deux lavages de 10 min, préférentiellement à 65°C, dans un tampon 2 x SSC et 0,1% SDS;
- deux lavages de 10 min, préférentiellement à 65°C, dans
20 un tampon 1 x SSC et 0,1% SDS;
- un lavage de 10 min, préférentiellement à 65°C, dans un tampon de 0,1 x SSC et 0,1% SDS.

1 x SSC correspond à 0,15 M NaCl et 0,05M citrate de Na et une solution de 1 x Denhardt correspond à 0,02% Ficoll, 0,02% de polyvinylpyrrolidone et 0,02% de sérum
25 albumine bovine.

Avantageusement, un fragment nucléotidique répondant à la définition précédente aura au moins 8 nucléotides, de
30 préférence au moins 12 nucléotides, et encore plus préférentiellement au moins 20 nucléotides consécutifs de la séquence dont il est issu. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-avant pour un polynucléotide d'une taille d'environ 200 bases, seront
35 adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

Pour les conditions de mise en oeuvre des enzymes de restriction dans le but d'obtenir des fragments nucléotidiques des polynucléotides selon l'invention, on se
5 réfèrera avantageusement à l'ouvrage de Sambrook et al., 1989.

Avantageusement, un polynucléotide de l'invention contiendra au moins une séquence comprenant l'enchaînement
10 de nucléotides allant du nucléotide en position nt 964 au nucléotide nt 1234 du polynucléotide de séquence SEQ ID N° 1.

La présente invention a pour objet un polynucléotide
15 selon l'invention, caractérisé en ce que sa séquence nucléique hybride avec l'ADN de séquence de mycobactéries et préférentiellement avec l'ADN de séquence de mycobactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*.

20

Le polynucléotide est codé par une séquence polynucléotidique telle que décrite supra.

La présente invention a également pour objet un
25 polypeptide issu d'une mycobactérie, caractérisé en ce qu'il est présent uniquement chez les mycobactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*.

L'invention concerne également un polypeptide
30 caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

a) un polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences d'acides aminés SEQ ID N°1 à SEQ ID N°24C,
35 SEQ ID N° 27A à SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 30 à SEQ ID N° 50F,

b) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a),

c) un fragment d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide défini en a) ou b),

d) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b), ou c).

5

La présente invention a aussi pour objet un polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, ou un polypeptide de séquence d'acides aminés SEQ ID N°28.

10

Par polypeptide homologue, on entendra désigner les polypeptides présentant, par rapport au polypeptide naturel selon l'invention tel que le polypeptide DP428, certaines modifications comme en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une mutation. Parmi les polypeptides homologues, on préfère ceux dont la séquence d'acides aminés présente au moins 30%, de préférence 50%, d'homologie avec les séquences d'acides aminés des polypeptides selon l'invention. Dans le cas d'une substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, sont remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression acide aminé « équivalent » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier essentiellement les propriétés immunogènes des peptides correspondants. En d'autres termes, les acides aminés équivalents seront ceux qui permettent l'obtention d'un polypeptide de séquence modifiée qui permet l'induction *in vivo* d'anticorps ou de cellules capables de reconnaître le polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés de polypeptide selon l'invention, telle que les séquences d'acides aminés SEQ ID N°1 à SEQ ID N° 2, ou un polypeptide de séquence d'acides aminés SEQ ID N°28

35

(polypeptide DP428) ou l'un de ses fragments ci-dessus définis.

Ces aminoacyles équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les aminoacyles auxquels ils se substituent, soit sur les résultats des essais d'immunogénicité croisée auxquels les différents peptides sont susceptibles de donner lieu.

A titre d'exemple, on mentionnera les possibilités de substitutions susceptibles d'être effectuées sans qu'il en résulte une modification approfondie de l'immunogénicité des peptides modifiés correspondants, les remplacements, par exemple, de la leucine par la valine ou l'isoleucine, de l'acide aspartique par l'acide glutamique, de la glutamine par l'asparagine, de l'arginine par la lysine etc., les substitutions inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Par fragment biologiquement actif, on entendra désigner en particulier un fragment de séquence d'acides aminés de polypeptide présentant au moins une des caractéristiques des polypeptides selon l'invention, notamment en ce qu'il est :

- capable d'être exporté et/ou sécrété par une mycobactérie, et/ou d'être induit ou réprimé lors de l'infection par la mycobactérie ; et/ou
- capable d'induire, de réprimer ou de moduler, directement ou indirectement, un facteur de virulence de mycobactérie ; et/ou
- capable d'induire une réaction d'immunogénicité dirigée contre les mycobactéries ; et/ou
- capable d'être reconnu par un anticorps spécifique de mycobactérie .

Par fragment de polypeptide, on entend désigner un polypeptide comportant au minimum 5 acides aminés, de préférence 10 acides aminés et 15 acides aminés.

Un polypeptide de l'invention, ou un de ses fragments, tels que définis précédemment, est susceptible d'être reconnu spécifiquement par les anticorps présents dans le sérum de patients infectés par des mycobactéries et préférentiellement des bactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis* ou par des cellules de l'hôte infecté.

Font ainsi partie de l'invention les fragments du polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés de polypeptide selon l'invention, telle que les séquences d'acides aminés SEQ ID N°1 à SEQ ID N°2, ou un polypeptide de séquence d'acides aminés SEQ ID N°28, qui peuvent être obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, telle que la trypsine ou la chymotrypsine ou la collagénase, ou par un réactif chimique, tel que le bromure de cyanogène (CNBr) ou encore en plaçant un polypeptide selon l'invention tel que le polypeptide DP428 dans un environnement très acide, par exemple à pH 2,5. Des fragments peptidiques préférés selon l'invention, pour une utilisation en diagnostic ou en vaccination, sont les fragments contenus dans des régions de polypeptide selon l'invention tel que le polypeptide DP428 susceptibles d'être naturellement exposées au solvant et de présenter ainsi des propriétés d'immunogénicité importante. De tels fragments peptidiques peuvent être préparés indifféremment par synthèse chimique, à partir d'hôtes transformés par un vecteur d'expression selon l'invention contenant un acide nucléique permettant l'expression desdits fragments, placé sous le contrôle des éléments de régulation et/ou d'expression appropriés ou encore par clivage chimique ou enzymatique.

Une analyse de l'hydrophilicité du polypeptide DP428 a été réalisée à l'aide du logiciel DNA Strider™ (commercialisé par le CEA Saclay), sur la base d'un calcul du caractère hydrophile de la région codante pour le DP428.

de la SEQ ID N°28. Les résultats de cette analyse sont présentés à la figure 54, où sont détaillés, pour chacun des acides aminés (AA) de position définie dans la SEQ ID N°28, l'indice d'hydrophilicité. Plus l'indice d'hydrophilicité est élevé, plus l'acide aminé considéré est susceptible d'être exposé au solvant dans la molécule native, et est en conséquence susceptible de présenter un degré d'antigénicité élevé. Ainsi, un enchaînement d'au moins sept acides aminés possédant un indice élevé d'hydrophilicité ($>0,3$) peut constituer la base de la structure d'un peptide candidat immunogène selon la présente invention.

Les réponses immunitaires cellulaires de l'hôte à un polypeptide selon l'invention, peuvent être mises en évidence selon les techniques décrites par Colignon et al., 1996.

D'après les données de la carte d'hydrophilicité présentée à la Figure 54, les inventeurs ont pu définir des régions du polypeptide DP428 préférentiellement exposées au solvant, plus particulièrement la région localisée entre les acides aminés 55 et 72 de la séquence SEQ ID N° 28 et la région localisée entre les acides aminés 99 et 107 de la SEQ ID N° 28.

Les régions peptidiques du polypeptide DP428 définies ci-dessus peuvent être avantageusement mises en oeuvre pour la réalisation des compositions immunogènes ou des compositions vaccinales selon l'invention.

Les polynucléotides caractérisés en ce qu'ils codent pour un polypeptide selon l'invention, font également partie de l'invention.

L'invention concerne également les séquences d'acide nucléique utilisables comme sonde ou amorce, caractérisées

en ce que lesdites séquences sont choisies parmi les séquences d'acide nucléique de polynucléotides selon l'invention.

5 L'invention concerne en outre l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique de polynucléotides selon l'invention comme sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquence d'acide nucléique. Parmi ces séquences d'acide nucléique selon l'invention utilisables
10 comme sonde ou amorce, on préfère les séquences d'acide nucléique de l'invention, caractérisée en ce que lesdites séquences sont des séquences, ou leur séquence complémentaire, comprises entre le nucléotide en position nt 964 et le nucléotide en position nt 1234, extrémités
15 incluses, de la séquence SEQ ID N°1.

Parmi les polynucléotides selon l'invention, utilisables comme amorces nucléotidiques, on préfère particulièrement les polynucléotides de séquence SEQ ID
20 N°25 et SEQ ID N°26.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés pour sélectionner des amorces nucléotidiques, notamment pour la technique PCR (Erlich, 1989 ; Innis et
25 al., 1990, et, Rolfs et al., 1991).

Cette technique nécessite le choix de paires d'oligonucléotides encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique
30 décrite dans le brevet américain U.S. N° 4 683 202. Ces amorces oligodésoxyribonucléotidiques ou oligoribonucléotidiques ont avantageusement une longueur d'au moins 8 nucléotides, de préférence d'au moins 12 nucléotides, et encore plus préférentiellement au moins 20 nucléotides. On
35 préférera en particulier des amorces d'une longueur comprise entre 8 et 30 et de préférence 12 et 22 nucléotides. L'une des deux amorces est complémentaires du

brin (+) [amorce aller] de la matrice et l'autre amorce est complémentaire du brin (-) [amorce retour]. Il est important que les amorces ne possèdent pas de structure secondaire ou de séquence complémentaire l'une de l'autre.

5 D'autre part, la longueur et la séquence de chaque amorce doivent être choisies de manière à ce que les amorces ne s'hybrident pas avec d'autres acides nucléiques provenant de cellules procaryotes ou eucaryotes, en particulier avec les acides nucléiques provenant d'autres mycobactéries

10 pathogènes, ni avec l'ADN ou l'ARN humain pouvant éventuellement contaminer l'échantillon biologique.

Les résultats présentés à la figure 51, montrent que la séquence codant pour le polypeptide DP428 (SEQ ID N° 28)

15 n'est pas retrouvée dans les ADNs de *M. fortuitum*, *M. simiae*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. flavescens*, *M. gordonae*, *M. marinum* et *M. kansasii*

Les fragments amplifiés peuvent être identifiés après

20 une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une électrophorèse capillaire, ou encore après une technique chromatographique (filtration sur gel, chromatographie hydrophobe ou chromatographie échangeuse d'ions). La spécificité de l'amplification peut être

25 contrôlée par hybridation moléculaire en utilisant comme sondes les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention, des plasmides contenant ces séquences ou leurs produits d'amplification.

30 Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques

35 amplifiés.

Parmi les polynucléotides selon l'invention, utilisables comme sondes nucléotidiques, on préfère tout particulièrement le fragment polynucléotidique comprenant la séquence comprise entre le nucléotide en position nt 964 et le nucléotide en position nt 1234, extrémités incluses, de la séquence de SEQ ID N°1.

Ces sondes et amplicons peuvent être marqués ou non par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives, telles que des enzymes ou des éléments fluorescents..

L'invention vise également les fragments nucléotidiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternatives à la PCR.

La technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992) est une technique d'amplification isotherme dont le principe est fondé sur la capacité d'une enzyme de restriction de couper l'un des deux brins de son site de reconnaissance qui se trouve sous une forme hemiphosphorothioate et sur la propriété d'une ADN polymérase d'initier la synthèse d'un nouveau brin d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH créée par l'enzyme de restriction et de déplacer le brin préalablement synthétisé qui se trouve en aval.

Les polynucléotides de l'invention, en particulier les amorces selon l'invention, peuvent également être mis en oeuvre dans d'autres procédés d'amplification d'un acide nucléique cible, tels que :

- la technique TAS (Transcription-based Amplification System), décrite par Kwoh et al. en 1989;

- la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), décrite par Guatelli et al. en 1990;
- la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), décrite par Kievitis et al. en 1991;
- 5 - la technique TMA (Transcription Mediated Amplification).

Les polynucléotides de l'invention peuvent aussi être employés dans des techniques d'amplification ou de modification de l'acide nucléique servant de sonde, telles que:

- 10 - la technique LCR (Ligase Chain Reaction), décrite par Landegren et al. en 1988 et perfectionnée par Barany et al. en 1991, qui emploie une ligase thermostable;
- la technique de RCR (Repair Chain Reaction), décrite par Segev en 1992;
- 15 - la technique CPR (Cycling Probe Reaction), décrite par Duck et al. en 1990;
- la technique d'amplification à la Q-beta-réplique, décrite par Miele et al. en 1983 et perfectionnée notamment par Chu et al. en 1986, Lizardi et al. en 1988, puis par
- 20 Burg et al. ainsi que par Stone et al. en 1996.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARN, par exemple un ARNm, on utilisera avantageusement, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction

25 d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARN contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors

30 de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La sonde de détection sera choisie de telle manière à

35 ce qu'elle hybride avec l'amplicon généré. Une telle sonde de détection aura avantageusement pour séquence une séquence d'au moins 12 nucléotides, en particulier d'au

moins 15 nucléotides, et de préférence au moins de 200 nucléotides.

Les sondes nucléotidiques selon l'invention sont capables de détecter des mycobactéries et
5 préférentiellement des bactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*, plus précisément du fait que ces mycobactéries possèdent dans leur génome au moins une copie de polynucléotides selon l'invention. Ces sondes selon l'invention, sont capables, par exemple, de
10 s'hybrider avec la séquence nucléotidique d'un polypeptide selon l'invention, plus particulièrement tout oligonucléotide hybridant avec la séquence SEQ ID N°1 codant pour le polypeptide DP428 de *M. tuberculosis*, et ne présentant pas de réaction d'hybridation croisée ou
15 d'amplification (PCR) avec par exemple des séquences présentes chez des mycobactéries n'appartenant pas au complexe de *Mycobacterium tuberculosis*. Les sondes nucléotidiques selon l'invention hybrident spécifiquement avec une molécule d'ADN ou d'ARN de polynucléotide selon
20 l'invention, dans des conditions d'hybridation de forte stringence telles que données sous forme d'exemple précédemment.

Les séquences non marquées peuvent être utilisées
25 directement comme sondes, cependant les séquences sont généralement marquées par un élément radioactif (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I) ou par une molécule non-radioactive (biotine, acétylaminofluorène, digoxigénine, 5-bromo-désoxyuridine, fluorescéine) pour obtenir des sondes utilisables pour de
30 nombreuses applications.

Des exemples de marquages non radioactifs de sondes sont décrits, par exemple, dans le brevet français N° 78.10975 ou par Urdea et al. ou par Sanchez-Pescador et al.
35 en 1988.

Dans ce dernier cas, on pourra aussi utiliser l'une des méthodes de marquage décrites dans les brevets FR 2 422 956 et FR 2 518 755. La technique d'hybridation peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La
5 méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de mycobactéries sur un support (tel que nitrocellulose, nylon, polystyrène) et à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après
10 l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

15 Avantageusement, les sondes nucléotidiques marquées selon l'invention peuvent avoir une structure telle qu'elles rendent possible une amplification du signal radioactif ou non-radioactif. Un système d'amplification répondant à la définition ci-dessus comprendra des sondes
20 de détection sous la forme d'un ADN ramifié, branché («branched DNA») telles que celles décrites par Urdea et al. en 1991. Selon cette technique, on utilisera avantageusement plusieurs types de sondes notamment une sonde de capture, afin d'immobiliser l'ADN ou l'ARN cible sur un
25 support, et une sonde de détection. La sonde de détection lie un ADN «branché» présentant une structure ramifiée. L'ADN branché, à son tour, est capable de fixer des sondes oligonucléotidiques qui sont elles-mêmes couplées à des molécules de phosphatase alcaline. Puis l'activité de cette
30 enzyme est mise en évidence grâce à un substrat chimio-luminescent, par exemple un dérivé du dioxétane-phosphate.

Selon un autre mode avantageux de mise en oeuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent
35 être immobilisées sur un support, de manière covalente ou non covalente, et utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, une sonde, dite «sonde de capture», est immobilisée

sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester. Si nécessaire, le support solide est séparé de l'échantillon et le duplex formé entre la sonde de capture et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite «sonde de détection», marquée par un élément facilement détectable.

Les fragments oligonucléotidiques peuvent être obtenus à partir des séquences selon l'invention, par coupure avec des enzymes de restriction, ou par synthèse chimique selon les méthodes classiques, par exemple selon la méthode décrite dans le brevet européen N° EP-0305929 (Millipore Corporation) ou encore par d'autres procédés.

Un mode de préparation approprié des acides nucléiques de l'invention comportant au maximum 200 nucléotides (ou 200 pb s'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) comprend les étapes suivantes :

- la synthèse d'ADN en utilisant la méthode automatisée des béta-cyanethylphosphoramidite décrite en 1986,
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération des acides nucléiques par hybridation avec une sonde appropriée.

Un mode de préparation, par voie chimique, d'acides nucléiques selon l'invention de longueur supérieure à 200 nucléotides (ou 200 pb lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) comprend les étapes suivantes :

- l'assemblage d'oligonucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leur extrémité de sites de restrictions différents, dont les séquences sont compatibles avec l'enchaînement en acides aminés du polypeptide naturel selon le principe décrit en 1983,
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération des acides nucléiques recherchés par hybridation avec une sonde appropriée.

Les sondes nucléotidiques utilisées pour la récupération des acides nucléiques recherchés dans les procédés sus-mentionnés, sont constituées généralement de 8 à 200 nucléotides de la séquence de polypeptide selon l'invention et sont susceptibles de s'hybrider avec l'acide nucléique recherché dans les conditions d'hybridation définies précédemment. La synthèse de ces sondes peut être effectuée selon la méthode automatisée des bêta cyanethylphosphoramidites décrite en 1986.

Les sondes oligonucléotidiques selon l'invention peuvent être mises en oeuvre au sein d'un dispositif de détection comprenant une banque matricielle d'oligonucléotides. Un exemple de réalisation d'une telle banque matricielle peut consister en une matrice d'oligonucléotides sondes fixés sur un support, la séquence de chaque sonde d'une longueur donnée étant située en décalage d'une ou plusieurs bases par rapport à la sonde précédente, chacune des sondes de l'arrangement matriciel étant ainsi complémentaire d'une séquence distincte de l'ADN ou l'ARN cible à détecter et chaque sonde de séquence connue étant fixée en une position prédéterminée du support. La séquence cible à détecter peut être avantageusement marquée radioactivement ou non radioactivement. Lorsque la séquence cible marquée est mise en contact avec le dispositif matriciel, celle-ci forme des hybrides avec les sondes de séquences complémentaires. Un traitement à la nucléase, suivi d'un lavage, permet d'éliminer les hybrides sondes-séquence cible qui ne sont pas parfaitement complémentaires. Du fait de la connaissance précise de la séquence d'une sonde à une position déterminée de la matrice, il est alors possible de déduire la séquence nucléotidique de la séquence d'ADN ou d'ARN cible. Cette technique est particulièrement efficace lorsque sont utilisées des matrices de sondes oligonucléotidiques de grande taille.

Une alternative à l'utilisation d'une séquence cible marquée peut consister en l'utilisation d'un support permettant une détection « bioélectronique » de l'hybridation de la séquence cible sur les sondes du support matrice, lorsque que ledit support est constitué ou comprend un matériau capable d'agir, par exemple, en tant que donneur d'électrons aux positions de la matrice auxquelles un hybride a été formé. Un tel matériau donneur d'électron est par exemple de l'or. La détection de la séquence nucléotidique de l'ADN ou ARN cible est alors déterminée par un dispositif électronique.

Un exemple de réalisation d'un biocapteur, tel que défini ci-dessus, est décrit dans la demande de brevet européen N° EP-0721 016 au nom de Affymax technologies N.V. ou encore dans le brevet américain N° US 5.202.231 au nom de Drmanac.

L'invention a aussi pour objet les polynucléotides hybrides résultant :

- 20 - soit de la formation d'une molécule hybride entre un ARN ou un ADN (ADN génomique ou ADNc) provenant d'un échantillon biologique avec une sonde ou une amorce selon l'invention.
- soit de la formation d'une molécule hybride entre un ARN
25 ou un ADN (ADN génomique ou ADNc) provenant d'un échantillon biologique avec un fragment nucléotidique amplifié à l'aide d'un couple d'amorces selon l'invention.

Par ADNc au sens de la présente invention, on entend une molécule d'ADN obtenue en faisant agir une enzyme de type transcriptase inverse sur une molécule d'ARN, en particulier une molécule d'ARN messenger (ARNm), selon les techniques décrites dans Sambrook et al. en 1989.

La présente invention a également pour objet une famille de plasmides recombinants, caractérisés en ce qu'ils contiennent au moins une séquence nucléotidique de polynucléotide selon l'invention. Selon un mode de réalisation avantageux dudit plasmide, il comprend la

séquence nucléotidique SEQ ID N°1 ou un fragment de celle-ci.

Un autre objet de la présente invention est un vecteur pour le clonage, l'expression et/ou l'insertion d'une
5 séquence, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique de polynucléotide selon l'invention en un site non essentiel pour sa réplication, le cas échéant sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans l'expression du polypeptide DP428, chez
10 un hôte déterminé.

Des vecteurs particuliers sont par exemple des plasmides, des phages, des cosmides, des phagemides, des YAC.

Ces vecteurs sont utiles pour transformer des cellules
15 hôtes afin de cloner ou d'exprimer les séquences nucléotidiques de l'invention.

L'invention comprend également les cellules hôtes transformées par un vecteur selon l'invention.

20

De préférence, les cellules hôtes sont transformées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant selon l'invention.

25 Une cellule hôte préférée selon l'invention est la souche *E. coli* transformée par le plasmide pDP428 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N° I-1818 ou transformée par le plasmide pM1C25 déposé le 4 août 1998 à la CNCM sous le n° I-2062 ou une mycobactérie appartenant à une souche
30 de *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum* possédant potentiellement tous les systèmes de régulation appropriés.

Il est aujourd'hui facile de produire des protéines ou polypeptides en quantité relativement importante par génie
35 génétique en utilisant comme vecteurs d'expression des plasmides, des phages, des phagemides. Tout ou partie du gène DP428, ou tout polynucléotide selon l'invention, peut être inséré dans un vecteur d'expression approprié pour

produire *in vitro* un polypeptide selon l'invention, notamment le polypeptide DP428. Ledit polypeptide pourra être fixé sur une microplaque pour développer un test sérologique destiné à rechercher, dans un but de diagnostic, les anticorps spécifiques chez les patients atteints de tuberculose.

Ainsi, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur selon l'invention. Plus particulièrement l'invention concerne un procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention comprenant les étapes suivantes :

- le cas échéant, l'amplification préalable suivant la technique PCR de la quantité de séquences de nucléotides codant pour ledit polypeptide à l'aide de deux amorces d'ADN choisies de manière à ce que l'une de ces amorces soit identique aux 10 à 25 premiers nucléotides de la séquence nucléotidique codant pour ledit polypeptide, tandis que l'autre amorce est complémentaire des 10 à 25 derniers nucléotides (ou s'hybride avec ces 10 à 25 derniers nucléotides) de ladite séquence nucléotidique, ou inversement de manière à ce que l'une de ces amorces soit identique aux 10 à 25 derniers nucléotides de ladite séquence, tandis que l'autre amorce est complémentaire des 10 à 25 premiers nucléotides (ou s'hybride avec les 10 à 25 premiers nucléotides) de ladite séquence nucléotidique, suivie de l'introduction desdites séquences ainsi amplifiées dans un vecteur approprié,
- la mise en culture, dans un milieu de culture approprié, d'un hôte cellulaire préalablement transformé par un vecteur approprié contenant un acide nucléique selon l'invention comprenant la séquence nucléotidique codant pour ledit polypeptide, et
- la séparation, à partir du susdit milieu de culture, dudit polypeptide produit par ledit hôte cellulaire transformé.

L'invention a aussi pour objet un polypeptide susceptible d'être obtenu par un procédé de l'invention tel que décrit précédemment.

5 Les peptides selon l'invention peuvent également être préparés par les techniques classiques, dans le domaine de la synthèse des peptides. Cette synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide.

10 Par exemple, on aura recours à la technique de synthèse en solution homogène décrite par Houbenweyl en 1974.

Cette méthode de synthèse consiste à condenser successivement deux-à-deux les aminoacyles successifs dans
15 l'ordre requis, ou à condenser des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les
20 fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragments, à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction
25 carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides. En variante, on pourra avoir recours à des réactions de couplage mettant en jeu des réactifs de couplage classique, du type carbodiimide, tels que par exemple la 1-éthyl-3-(3-diméthyl-aminopropyl)-carbodiimide.

30 Lorsque l'aminoacyle mis en oeuvre possède une fonction acide supplémentaire (notamment dans le cas de l'acide glutamique), ces fonctions seront protégées, par exemple par des groupes t-butylester.

Dans le cas de la synthèse progressive, acide aminé
35 par acide aminé, la synthèse débute de préférence par la condensation de l'acide aminé C-terminal avec l'acide aminé qui correspond à l'acide aminé voisin dans la séquence

désirée et ainsi de suite, de proche en proche, jusqu'à l'acide aminé N-terminal.

Selon une autre technique préférée de l'invention, on a recours à celle décrite par Merrifield.

5 Pour fabriquer une chaîne peptidique selon le procédé de Merrifield, on a recours à une résine polymère très poreuse, sur laquelle on fixe le premier acide aminé C-terminal de la chaîne. Cet acide aminé est fixé sur la résine par l'intermédiaire de son groupe carboxylique et sa
10 fonction amine est protégée, par exemple par le groupe t-butyloxycarbonyle.

Lorsque le premier acide aminé C-terminal est ainsi fixé sur la résine, on enlève le groupe protecteur de la
15 fonction amine en lavant la résine avec un acide.

Dans le cas où le groupe protecteur de la fonction amine est le groupe t-butyloxycarbonyle, il peut être éliminé par traitement de la résine à l'aide d'acide
20 trifluoroacétique.

On couple ensuite le deuxième acide aminé qui fournit le second aminoacycle de la séquence recherchée, à partir du résidu aminoacycle C-terminal sur la fonction amine
25 déprotégée du premier acide aminé C-terminal fixé sur la chaîne. De préférence, la fonction carboxyle de ce deuxième acide aminé est activée, par exemple par la dicyclohexylcarbodiimide, et la fonction amine est protégée, par exemple par le t-butyloxycarbonyle.

30 On obtient ainsi la première partie de la chaîne peptidique recherchée, qui comporte deux acides aminés, et dont la fonction amine terminale est protégée. Comme précédemment, on déprotège la fonction amine et on peut ensuite procéder à la fixation du troisième aminoacycle,
35 dans des conditions analogues à celles de l'addition du deuxième acide aminé C-terminal.

On fixe ainsi, les uns après les autres, les acides aminés qui vont constituer la chaîne peptidique sur le groupe amine chaque fois déprotégé au préalable de la portion de la chaîne peptidique déjà formée, et qui est
5 rattachée à la résine.

Lorsque la totalité de la chaîne peptidique désirée est formée, on élimine les groupes protecteurs des différents acides aminés constituant la chaîne peptidique et on détache le peptide de la résine, par exemple à l'aide
10 d'acide fluorhydrique.

De manière préférentielle, lesdits polypeptides susceptibles d'être obtenus par un procédé de l'invention tel que décrit précédemment comprendront une région exposée
15 au solvant et auront une longueur d'au moins 20 acides aminés.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, lesdits polypeptides sont spécifiques de mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et ne sont donc pas
20 reconnus par des anticorps spécifiques d'autres protéines de mycobactéries.

L'invention est en outre relative à des polypeptides
25 hybrides présentant au moins un polypeptide selon l'invention et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

Avantageusement, le déterminant antigénique est tel qu'il est susceptible d'induire une réponse humorale et/ou
30 cellulaire.

Un tel déterminant pourra comprendre un polypeptide selon l'invention sous forme glycosylée utilisé en vue d'obtenir des compositions immunogènes susceptibles
35 d'induire la synthèse d'anticorps dirigés contre des épitopes multiples. Lesdits polypeptides glycosylés font également partie de l'invention.

Ces molécules hybrides peuvent être constituées en partie d'une molécule porteuse de polypeptide selon l'invention associée à une partie, en particulier un épitope de la toxine diphtérique, la toxine tétanique, un
5 antigène de surface du virus de l'hépatite B (brevet FR 79 21811), l'antigène VP1 du virus de la poliomyélite ou toute autre toxine ou antigène viral ou bactérien.

Avantageusement, ledit déterminant antigénique
10 correspond à un déterminant antigénique de protéines immunogènes de 45/47 kD de *M. tuberculosis* (demande internationale PCT/FR 96/0166), ou encore sélectionnées par exemple parmi ESAT6 (Harboe et al., 1996, Andersen et al., 1995, et Sorensen et al., 1995) et DES (PCT/FR 97/00923,
15 Gicquel et al.).

Un antigène viral, tel que défini ci-dessus, sera préférentiellement une protéine de surface ou d'enveloppe d'un virus de l'hépatite, par exemple la protéine de
20 surface de l'hépatite B sous l'une de ses formes S, S-prés1, S-prés2 ou S-prés2-prés1 ou encore une protéine d'un virus de l'hépatite A, ou d'une hépatite non-A, non-B, tel qu'un virus de l'hépatite C, E ou delta.

25 Plus particulièrement, un antigène viral tel que défini ci-dessus sera tout ou partie de l'une des glycoprotéines codées par le génome du virus HIV-1 (brevets GB 8324800, EP 84401834 ou EP 85905513) ou du virus HIV-2 (EP 87400151), et en particulier tout ou partie d'une
30 protéine sélectionnée parmi gag, pol, nef ou env de HIV-1 ou de HIV-2.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour
35 construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique

d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par Minton en 1984.

Lesdits polynucléotides hybrides codant pour un polypeptide hybride ainsi que les polypeptides hybrides selon l'invention caractérisés en ce qu'il s'agit de protéines recombinantes obtenues par l'expression desdits polynucléotides hybrides, font également partie de l'invention.

10

Les polypeptides selon l'invention peuvent avantageusement être mis en oeuvre dans un procédé pour la détection *in vitro* d'anticorps dirigés contre lesdits polypeptides, notamment le polypeptide DP428, et ainsi d'anticorps dirigés contre une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, dans un échantillon biologique (tissu ou fluide biologique) susceptible de les contenir, ce procédé comprenant la mise en contact de cet échantillon biologique avec un polypeptide selon l'invention dans des conditions permettant une réaction immunologique *in vitro* entre ledit polypeptide et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique, et la mise en évidence *in vitro* des complexes antigène-anticorps éventuellement formés.

25

Les polypeptides selon l'invention peuvent également et avantageusement être mis en oeuvre dans un procédé pour la détection d'une infection par une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un mammifère basé sur la détection *in vitro* d'une réaction cellulaire indiquant une sensibilisation préalable du mammifère audit polypeptide comme par exemple la prolifération cellulaire, la synthèse de protéines telles que l'interféron gamma. Ce procédé pour la détection d'une infection par une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un mammifère, est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

35

- a) préparation d'un échantillon biologique contenant des cellules dudit mammifère plus particulièrement des cellules du système immunitaire dudit mammifère et plus particulièrement encore des cellules T ;
- 5 b) incubation de l'échantillon biologique de l'étape a) avec un polypeptide selon l'invention;
- c) détection d'une réaction cellulaire indiquant une sensibilisation préalable du mammifère audit polypeptide comme par exemple la prolifération cellulaire et/ou la
- 10 synthèse de protéines telles que l'interféron gamma.
- La prolifération cellulaire pourra être mesurée, par exemple par incorporation de ³H-Thymidine.

Font également partie de l'invention, les procédés de

15 détection d'une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH), caractérisés en ce qu'ils mettent en oeuvre un polypeptide selon l'invention.

De préférence, l'échantillon biologique est constitué

20 par un fluide, par exemple un sérum humain ou animal, du sang, des biopsies, le liquide broncho-alvéolaire ou le liquide pleural.

Toute procédure classique peut être mise en oeuvre

25 pour réaliser une telle détection.

A titre d'exemple, une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-immunologique (RIA) ou

30 équivalent.

Ainsi, l'invention concerne également les polypeptides selon l'invention, marqués à l'aide d'un marqueur adéquat tel que du type enzymatique, fluorescent, radioactif.

35 De telles méthodes comprennent par exemple les étapes suivantes :

- dépôt de quantités déterminées d'une composition polypeptidique selon l'invention dans les puits d'une plaque de microtitration,
- introduction dans lesdits puits de dilutions croissantes
5 de sérum, ou d'échantillon biologique autre tel que défini précédemment, devant être analysé,
- incubation de la microplaque,
- introduction dans les puits de la plaque de microtitration d'anticorps marqués dirigés contre des
10 immunoglobulines humaines ou animales, le marquage de ces anticorps ayant été réalisé à l'aide d'une enzyme sélectionnée parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat en modifiant l'absorption des radiations de ce dernier, au moins à une longueur d'onde déterminée, par
15 exemple à 550 nm,
- détection, en comparaison avec un témoin de contrôle, de la quantité de substrat hydrolysé.

L'invention concerne également un nécessaire ou kit
20 pour le diagnostic in vitro d'une infection par une mycobactérie appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*, comprenant:

- un polypeptide selon l'invention,
- le cas échéant les réactifs pour la constitution du
25 milieu propice à la réaction immunologique ou spécifique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique éventuellement présents dans l'échantillon biologique, et la mise en évidence in vitro des complexes antigène-
30 anticorps éventuellement formés, ces réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le polypeptide selon l'invention n'est pas marqué,
- 35 - le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par un polypeptide selon l'invention,

- le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'anticorps reconnus par un polypeptide selon l'invention.

5 Les polypeptides selon l'invention permettent de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement les polypeptides selon l'invention. Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être préparés à partir
10 d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 1975. Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple par immunisation d'un animal, en particulier une souris, avec un polypeptide selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse
15 immunitaire, puis purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixé le polypeptide ayant servi d'antigène. Les anticorps polyclonaux selon l'invention peuvent aussi être préparés
20 par purification sur une colonne d'affinité, sur laquelle a préalablement été immobilisé un polypeptide selon l'invention, des anticorps contenus dans le sérum de patients infectés par une mycobactérie et préférentiellement une bactérie appartenant au complexe
25 *Mycobacterium tuberculosis*.

L'invention a également pour objet des anticorps mono ou polyclonaux ou leurs fragments, ou anticorps
30 chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention.

Les anticorps de l'invention pourront également être
35 marqués de la même manière que décrit précédemment pour les

sondes nucléiques de l'invention tel qu'un marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

L'invention vise en outre un procédé pour la détection
5 spécifique de la présence d'un antigène d'une mycobactérie et préférentiellement un bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 a) Mise en contact de l'échantillon biologique (tissu ou fluide biologique) prélevé chez un individu avec un anticorps mono ou polyclonal selon l'invention , dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdits anticorps et les polypeptides spécifiques des
15 mycobactéries et préférentiellement des bactéries du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* éventuellement présents dans l'échantillon biologique, et
b) Mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

20 Entre également dans le cadre de l'invention, un nécessaire ou kit pour le diagnostic in vitro sur un échantillon biologique, de la présence de souches de mycobactéries des mycobactéries et préférentiellement des bactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium*
25 *tuberculosis*, de préférence *M. tuberculosis*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention, le cas échéant marqué;
- le cas échéant, un réactif pour la constitution du milieu
30 propice à la réalisation de la réaction immunologique;
- un réactif permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique, ce réactif pouvant également porter un marqueur, ou être susceptible d'être reconnu à son tour par un réactif
35 marqué, plus particulièrement dans le cas où ledit anticorps monoclonal ou polyclonal n'est pas marqué.

- le cas échéant, des réactifs pour effectuer la lyse des cellules de l'échantillon testé.

La présente invention a également pour objet un
5 procédé de détection et d'identification rapide des mycobactéries et préférentiellement des bactéries de *M. tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- a) Isolement de l'ADN à partir de l'échantillon
10 biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ;
- b) Amplification spécifique de l'ADN des mycobactéries et préférentiellement des bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* à l'aide d'amorces selon
15 l'invention;
- c) Analyse des produits d'amplification.

Le produits d'amplification peuvent être analysés par différentes méthodes.

20 Deux méthodes d'analyse sont données à titre d'exemple ci-dessous :

- Analyse électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplification. La présence d'un fragment d'ADN migrant à l'endroit attendu suggère que l'échantillon
25 analysé contenait de l'ADN de mycobactéries appartenant au complexe tuberculosis, ou

- Analyse par la technique d'hybridation moléculaire en utilisant une sonde nucléique selon l'invention. Cette sonde sera avantageusement marquée par un élément non
30 radioactif (sonde froide) ou radioactif.

Aux fins de la présente invention, on entendra par « ADN de l'échantillon biologique » ou « ADN contenu dans l'échantillon biologique », soit l'ADN présent dans
35 l'échantillon biologique considéré, soit l'ADNc obtenu après l'action d'une enzyme de type transcriptase inverse sur l'ARN présent dans ledit échantillon biologique.

Un autre procédé de la présente invention permet la détection d'une infection par une mycobactérie et
5 préférentiellement une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un mammifère. Ce procédé comprend les étapes suivantes :

- a) préparation d'un échantillon biologique contenant des cellules dudit mammifère plus particulièrement des cellules
10 du système immunitaire dudit mammifère et plus particulièrement encore des cellules T ;
- b) incubation de l'échantillon biologique de l'étape a) avec un polypeptide selon l'invention;
- c) détection d'une réaction cellulaire indiquant une
15 sensibilisation préalable du mammifère audit polypeptide notamment la prolifération cellulaire et/ou la synthèse de protéines telles que l'interféron gamma;
- d) détection d'une réaction d'hypersensibilité retardée ou de sensibilisation du mammifère audit polypeptide.

20

Cette méthode de détection est une méthode intradermique, qui est décrite par exemple par M. J. Elhay et al. (1988) *Infection and Immunity*, 66(7) : 3454-3456.

- 25 Un autre but de la présente invention consiste en un procédé pour la détection des mycobactéries et préférentiellement des bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 30 a) Mise en contact d'une sonde oligonucléotidique selon l'invention avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, ou l'ADNc obtenu par transcription inverse de l'ARN de l'échantillon biologique, ayant, le cas échéant, préalablement été rendu accessible à
35 l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN ou l'ADNc des mycobactéries et

préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*;

b) Détection de l'hybride formé entre la sonde oligonucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

5

L'invention vise également un procédé pour la détection des mycobactéries et préférentiellement des bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend

10 les étapes suivantes :

a) Mise en contact d'une sonde oligonucléotidique selon l'invention immobilisée sur un support, avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon biologique ayant, le cas échéant, été préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de ladite sonde à l'ADN des mycobactéries et préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*;

15

b) Mise en contact de l'hybride formé entre ladite sonde oligonucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé avec la sonde, avec une sonde oligonucléotidique marquée selon l'invention.

20

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de détection défini précédemment, celui-ci est caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon biologique est préalablement amplifié à l'aide d'un couple d'amorces selon l'invention.

25

Une autre forme de mise en oeuvre du procédé de détection selon l'invention consiste en un procédé pour la détection de la présence des mycobactéries et préférentiellement des bactéries appartenant au complexe de

30

Mycobacterium tuberculosis dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) Mise en contact de l'échantillon biologique avec un couple d'amorces selon l'invention, l'ADN contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant une hybridation desdites amorces à l'ADN des mycobactéries et préférentiellement des bactéries du
- 10 complexe *Mycobacterium tuberculosis*;
- b) Amplification de l'ADN d'une mycobactérie et préférentiellement d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis*;
- 15 c) mise en évidence de l'amplification de fragments d'ADN correspondant au fragment encadré par les amorces, par exemple par électrophorèse sur gel ou au moyen d'une sonde oligonucléotidique selon invention.

20

L'invention a aussi pour objet un procédé pour la détection de la présence des mycobactéries et préférentiellement des bactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique

25 par déplacement de brin, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) Mise en contact de l'échantillon biologique avec deux couples d'amorces selon l'invention spécifiquement destinées à l'amplification de type SDA décrites ci-dessus,
- 30 l'ADN contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN des mycobactéries et préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*;

b) amplification de l'ADN des mycobactéries et préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*;

c) mise en évidence de l'amplification de fragments d'ADN correspondant au fragment encadré par les amorces, par exemple par électrophorèse sur gel ou au moyen d'une sonde oligonucléotidique selon l'invention.

L'invention concerne aussi un nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre du procédé décrit ci-dessus, destiné à la détection de la présence des mycobactéries et préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) Une sonde oligonucléotidique selon l'invention;
- b) Les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation;
- c) Le cas échéant, un couple d'amorces selon l'invention ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN (ADN génomique, ADN plasmidique ou ADNc) des mycobactéries et préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

L'invention a aussi pour objet un kit ou nécessaire pour la détection de la présence des mycobactéries et préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) Une sonde oligonucléotidique, dite sonde de capture, selon l'invention;
- b) Une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, selon l'invention.
- c) Le cas échéant, un couple d'amorces selon l'invention ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN des mycobactéries et

préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

L'invention concerne encore un kit ou nécessaire pour
5 l'amplification de l'ADN des mycobactéries et
préférentiellement des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* présent dans un échantillon biologique,
caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- 10 a) Un couple d'amorces selon l'invention;
- b) Les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN;
- c) Eventuellement un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une
15 sonde oligonucléotidique selon l'invention.

Un autre objet de la présente invention concerne une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide selon l'invention.

20

Une autre composition immunogène selon l'invention est caractérisé en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides selon l'invention et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'invention.

25

Selon un mode de réalisation avantageux, la composition immunogène ci-dessus définie est constitutive d'un vaccin, lorsqu'elle est présentée en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement
30 un ou plusieurs adjuvants de l'immunité tels que l'alun ou un représentant de la famille des muramyl peptides ou encore l'adjuvant incomplet de Freund.

Aujourd'hui, divers types de vaccins sont disponibles
35 pour protéger l'homme contre des maladies infectieuses : micro-organismes vivants atténués (*M. bovis* - BCG pour la

tuberculose), micro-organismes inactivés (virus de la grippe), des extraits acellulaires (*Bordetella pertussis* pour la coqueluche), protéines recombinées (antigène de surface du virus de l'hépatite B), des polysides (pneumocoques). Des vaccins préparés à partir de peptides de synthèse ou de micro-organismes génétiquement modifiés exprimant des antigènes hétérologues sont en cours d'expérimentation. Plus récemment encore, des ADN plasmidiques recombinés portant des gènes codant pour des antigènes protecteurs ont été proposés comme stratégie vaccinale alternative. Ce type de vaccination est réalisé avec un plasmide particulier dérivant d'un plasmide de *E. coli* qui ne se réplique pas *in vivo* et qui code uniquement pour la protéine vaccinnante. Les principaux composants fonctionnels de ce plasmide sont : un promoteur fort permettant l'expression dans les cellules eucaryotes (par exemple celui du CMV), un site de clonage approprié pour insérer le gène d'intérêt, une séquence de terminaison-polyadénylation, une origine de réplication procaryote pour produire le plasmide recombiné *in vitro* et un marqueur de sélection (par exemple le gène de résistance à l'ampicilline) pour faciliter la sélection des bactéries qui contiennent le plasmide. Des animaux ont été immunisés en injectant simplement l'ADN plasmidique nu dans le muscle. Cette technique conduit à l'expression de la protéine vaccinnale *in situ* et à une réponse immunitaire en particulier de type cellulaire (CTL) et de type humoral (anticorps). Cette double induction de la réponse immunitaire est l'un des principaux avantages de la technique de vaccination avec de l'ADN nu. Huygen et al. (1996) et Tascon et al. (1996) ont réussi à obtenir une certaine protection contre *M. tuberculosis* en injectant des plasmides recombinés contenant des gènes de *M. leprae* (*hsp65*, *36kDa pra*) comme inserts. *M. leprae* est l'agent responsable de la lèpre. L'utilisation d'un insert spécifique de *M. tuberculosis* comme par exemple

tout ou partie du gène DP428, objet de la présente invention conduirait probablement à une meilleure protection contre la tuberculose. Tout ou partie du gène DP428, ou tout polynucléotide selon l'invention, peut être
5 facilement inséré dans les plasmides vecteurs VIJ (Montgomery et al, 1993), pcDNA3 (Invitrogen, R & D Systems) ou pcDNA1/Neo (Invitrogen) qui possèdent les caractéristiques nécessaires pour une utilisation vaccinale.

10

L'invention vise ainsi un vaccin, caractérisée en ce qu'il comprend un ou plusieurs polypeptides selon l'invention et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'invention tels que précédemment définis en
15 association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

L'invention vise aussi une composition vaccinale
20 destinée à l'immunisation de l'homme ou l'animal à l'encontre d'une infection bactérienne ou virale, telle que la tuberculose ou l'hépatite, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides hybrides tels que précédemment définis en association avec un véhicule
25 pharmaceutiquement compatible et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité.

Avantageusement, dans le cas d'une protéine hybride entre un polypeptide selon l'invention et l'antigène de
30 surface de l'hépatite B, la composition vaccinale sera administrée, chez l'homme, à raison de 0,1 à 1 μg de protéine hybride purifiée par kilogramme du poids du patient, de préférence 0,2 à 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids du patient, pour une dose destinée à une administration donnée. Dans le
35 cas de patients atteints de troubles du système immunitaire, en particulier les patients immunodéprimés, chaque dose injectée contiendra préférentiellement la

moitié de la quantité pondérale de la protéine hybride contenue dans une dose destinée à un patient n'étant pas affecté de troubles du système immunitaire.

5 De préférence, la composition vaccinale sera administrée à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps, par voie intradermique ou sous-cutanée. A titre d'exemple, trois doses telles que définies ci-dessus seront respectivement administrées au patient au temps t_0 , au
10 temps $t_0 + 1$ mois et au temps $t_0 + 1$ an.

Alternativement, trois doses seront respectivement administrées au patient au temps t_0 , au temps $t_0 + 1$ mois et au temps $t_0 + 6$ mois.

15 Chez la souris, chez laquelle une dose pondérale de la composition vaccinale comparable à la dose utilisée chez l'homme est administrée, la réaction anticorps est testée par prélèvement du sérum suivi d'une étude de la formation d'un complexe entre les anticorps présents dans le sérum et
20 l'antigène de la composition vaccinale, selon les techniques usuelles.

L'invention concerne également une composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend un
25 polynucléotide ou un vecteur d'expression selon l'invention, en association avec un véhicule permettant son administration à l'homme ou l'animal.

L'invention a encore pour objet un vaccin destiné à
30 l'immunisation à l'encontre d'une infection bactérienne ou virale, telle que la tuberculose ou l'hépatite, caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide ou un vecteur d'expression selon l'invention, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

35

De telles compositions immunogènes ou vaccinales sont notamment décrites dans la demande internationale N° WO

90/11092 (Vical Inc.) et également dans la demande internationale N° WO 95/11307 (Institut Pasteur).

Le polynucléotide constitutif de la composition
5 immunogène ou de la composition vaccinale selon l'invention peut être injecté à l'hôte après avoir été couplé à des composés qui favorisent la pénétration de ce polynucléotide à l'intérieur de la cellule ou son transport jusqu'au noyau cellulaire. Les conjugués résultants peuvent être
10 encapsulés dans des microparticules polymères, comme décrit dans la demande internationale N° WO 94/27238 (medisorb Technologies International).

Selon un autre mode de réalisation de la composition
15 immunogène et/ou vaccinale selon l'invention, le polynucléotide, de préférence un ADN, est complexé avec du DEAE-dextran (Pagano et al., 1967) ou avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., 1989), avec des lipides (Felgner et al., 1987) ou encore encapsulés dans des liposomes
20 (Fraley et al., 1980).

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de la composition immunogène et/ou vaccinale selon l'invention, le polynucléotide selon l'invention peut être
25 introduit sous la forme d'un gel facilitant sa transfection dans les cellules. Une telle composition sous forme de gel peut être un complexe de poly-L-lysine et de lactose, comme décrit par Midoux en 1993, ou encore le Poloxamer 407™, comme décrit par Pastore en 1994. Le polynucléotide ou le
30 vecteur selon l'invention peuvent aussi être en suspension dans une solution tampon ou être associés à des liposomes.

Avantageusement, un tel vaccin sera préparé conformément à la technique décrite par Tacson et al. ou
35 Huygen et al. en 1996 ou encore conformément à la technique décrite par Davis et al. dans la demande internationale N° WO 95/11307 (Whalen et al.).

Un tel vaccin sera avantageusement préparé sous la forme d'une composition contenant un vecteur selon l'invention, placée sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression chez l'homme ou l'animal.

Pour réaliser un tel vaccin, le polynucléotide selon l'invention est tout d'abord sous-cloné dans un vecteur d'expression approprié, plus particulièrement un vecteur d'expression contenant des signaux de régulation et d'expression reconnus par les enzymes des cellules eucaryotes et contenant également une origine de réplication active chez les procaryotes, par exemple chez *E. coli*, qui permet son amplification préalable. Puis le plasmide recombinant purifié obtenu est injecté à l'hôte, par exemple par voie intramusculaire.

On pourra par exemple utiliser, en tant que vecteur d'expression in vivo de l'antigène d'intérêt, le plasmide pCDNA3 ou le plasmide pCDNA1/neo, tous les deux commercialisés par Invitrogen (R&D Systems, Abingdon, Royaume-Uni). On peut aussi utiliser le plasmide VIJns.tPA, décrit par Shiver et al. en 1995.

Un tel vaccin comprendra avantageusement, outre le vecteur recombinant, une solution saline, par exemple une solution de chlorure de sodium.

Une composition vaccinale telle que définie ci-dessus sera par exemple administrée par voie parentérale ou par voie intramusculaire.

30

La présente invention concerne également un vaccin caractérisé en ce qu'il contient une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention et/ou un ou plusieurs polynucléotides tel que mentionné ci-dessus en association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible et, le cas

35

échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

Un autre aspect porte sur une méthode de criblage de
5 molécules capables d'inhiber la croissance de mycobactéries
ou le maintien de mycobactéries dans un hôte, caractérisée
en ce que lesdites molécules bloquent la synthèse ou la
fonction des polypeptides codés par une séquence
nucléotidique selon l'invention ou par un polynucléotide
10 tel que décrit supra.

Dans ladite méthode de criblage, les molécules peuvent
être des anti-messagers ou peuvent induire la synthèse
d'anti-messagers.

15

La présente invention vise également des molécules
capables d'inhiber la croissance de mycobactéries ou le
maintien de mycobactéries dans un hôte, caractérisées en ce
que lesdites molécules sont synthétisées d'après la
20 structure des polypeptides codés par une séquence
nucléotidique selon l'invention ou par un polynucléotide
tel que décrit supra.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention
25 apparaissent dans les exemples et les figures suivants :

FIGURES

30 La série de Figures 1 :

La série de Figures 1 illustre la série de séquences
nucléotidiques SEQ ID N°1 correspondant à l'insert du
vecteur pDP428 (déposé à la CNCM sous le N° I-1818) et
35 la série de séquences d'acides aminés SEQ ID N°1 des

polypeptides codés par la série des séquences nucléotidiques SEQ ID N°1.

Figure 2 :

- 5 Illustre la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 correspondant à la région incluant le gène codant pour le polypeptide DP428 (région soulignée). Sur cette figure ont été pris en compte à la fois les codons ATG et GTG d'initiation de la traduction. La figure fait
- 10 apparaître que le polypeptide DP428 fait probablement partie d'un opéron comprenant au moins trois gènes. La région doublement encadrée inclut probablement les régions promotrices.
- 15 La région simplement encadrée correspond au motif LPISG rapellant le motif LPXTG décrit chez les bactéries à Gram positifs comme permettant l'ancrage aux peptidoglycannes.

20 La série de Figures 3 :

La série de Figures 3 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°3 correspondant à l'insert du vecteur p6D7 (déposé à la CNCM sous le N° I-1814).

25

La série de Figures 4 :

- La série de Figures 4 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°4 correspondant à l'insert du
- 30 vecteur p5A3 (déposé à la CNCM sous le N° I-1815).

La série de Figures 5 :

- La série de Figures 5 représente la série de séquences
- 35 nucléotidiques SEQ ID N°5 correspondant à l'insert du vecteur p5F6 (déposé à la CNCM sous le N° I-1816).

La série de Figures 6 :

La série de Figures 6 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°6 correspondant à l'insert du vecteur p2A29 (déposé à la CNCM sous le N° I-1817).

La série de Figures 7 :

La série de Figures 7 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°7 correspondant à l'insert du vecteur p5B5 (déposé à la CNCM sous le N° I-1819).

La série de Figures 8 :

La série de Figures 8 représente série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°8 correspondant à l'insert du vecteur p1C7 (déposé à la CNCM sous le N° I-1820).

La série de Figures 9 :

La série de Figures 9 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°9 correspondant à l'insert du vecteur p2D7 (déposé à la CNCM sous le N° I-1821).

La série de Figures 10 :

La série de Figures 10 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°10 correspondant à l'insert du vecteur p1B7 (déposé à la CNCM sous le N° I-1843).

La série de Figures 11 :

La série de Figures 11 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°11.

La série de Figures 12 :

La série de Figures 12 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°12.

La série de Figures 13 :

5

La série de Figures 13 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°13.

La série de Figures 14 :

10

La série de Figures 14 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°14 correspondant à l'insert du vecteur pSB5 (déposé à la CNCM sous le N° I-1819).

15

La série de Figures 15 :

La série de Figures 15 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°15.

20

La série de Figures 16 :

La série de Figures 16 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°16.

25

La série de Figures 17 :

La série de Figures 17 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°17.

30

La série de Figures 18 :

La série de Figures 18 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°18.

35

La série de Figures 19 :

La série de Figures 19 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°19.

5 La série de Figures 20 :

La série de Figures 20 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°20 correspondant à l'insert du vecteur p2A29 (déposé à la CNCM sous le N° I-1817).

10

La série de Figures 21 :

La série de Figures 21 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°21.

15

La série de Figures 22 :

La série de Figures 22 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°22.

20

La série de Figures 23 :

La série de Figures 23 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°23.

25

La série de Figures 24 :

La série de Figures 24 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°24.

30

Figures 25 et 26 :

Les figures 25 et 26 illustrent respectivement les séquences SEQ ID N°25 et SEQ ID N°26 représentant un couple d'amorces utilisées pour amplifier
35 spécifiquement par PCR la région correspondant aux nucléotides 964 à 1234 inclus dans la séquence SEQ ID N°1.

La série de Figures 27 :

La série de Figures 27 représente la série de séquences
5 nucléotidiques SEQ ID N°27 correspondant à l'insert du
vecteur p5A3.

Figure 28 :

10 La séquence d'acides aminés telle que définie dans la
figure 28 représente la séquence d'acides aminés SEQ ID
N°28 correspondant au polypeptide DP428.

15 Figure 29 :

La figure 29 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N°
29 du gène complet codant pour la protéine M1C25.

20 Figure 30 :

La figure 30 représente la séquence d'acides aminés SEQ ID
N° 30 de la protéine M1C25.

25 La série de Figures 31 :

La série de Figures 31 représente la série de séquences
nucléotidiques SEQ ID N°31.

30 La série de Figures 32 :

La série de Figures 32 représente la série de séquences
nucléotidiques SEQ ID N°32.

35 La série de Figures 33 :

La série de Figures 33 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°33.

La série de Figures 34 :

5

La série de Figures 32 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°34.

La série de Figures 35 :

10

La série de Figures 35 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°35.

15

La série de Figures 36 :

La série de Figures 36 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°36.

20

La série de Figures 37 :

La série de Figures 37 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°37.

25

La série de Figures 38 :

La série de Figures 38 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°38.

30

La série de Figures 39 :

La série de Figures 39 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°39.

35

La série de Figures 40 :

La série de Figures 40 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°40.

La série de Figures 41 :

5

La série de Figures 41 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°41 correspondant à l'insert du vecteur p2D7 (déposé à la CNCM sous le N°I-1821).

10 La série de Figures 42 :

La série de Figures 42 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°42.

15

La série de Figures 43 :

La série de Figures 43 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°43.

20

La série de Figures 44 :

La série de Figures 44 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°44.

25

La série de Figures 45 :

La série de Figures 45 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°45.

30

La série de Figures 46 :

La série de Figures 46 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°46.

35

La série de Figures 47 :

La série de Figures 47 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°47.

5 La série de Figures 48 :

La série de Figures 48 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°48.

10 La série de Figures 49 :

La série de Figures 49 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°49.

15

La série de Figures 50 :

La série de Figures 50 représente la série de séquences nucléotidiques SEQ ID N°50.

20

Figure 51 :

A. la construction pJVED: Plasmid navette(pouvant se multiplier chez les mycobactéries ainsi que chez
25 E.coli). avec un gène de résistance à la kanamycine (issu de Tn903) comme marqueur de sélection. Le gène *phoA* tronqué(Δ *phoA*) et le gène *luc* forment un opéron synthétique.

B. Séquence de la jonction entre *phoA* et *luc*.

30

Figure 51 :

Hybridation génomique (Southern blot) de l'ADN génomique de différentes espèces mycobactériennes à
35 l'aide d'une sonde oligonucléotidique dont la séquence est la séquence comprise entre le nucléotide en

position nt 964 (extrémité 5' de la sonde) et le nucléotide en position nt 1234 (extrémité 3' de la sonde), extrémités inclues, de la séquence SEQ ID N°1.

5 Figures 53 et 54 :

Activités Luc et PhoA de *M. smegmatis* recombinant contenant le pJVED avec différents fragments nucléotidiques comme décrits en exemple. Les figures 52 et 53 représentent les résultats obtenus pour deux expériences distinctes réalisées dans les mêmes conditions.

15

Figure 55 :

Représentation de l'hydrophobicité (Kyte et Doolittle) de la séquence codante du polypeptide DP428 avec sa représentation schématique. Le motif LPISG précède immédiatement la région C-terminale hydrophobe. La séquence se termine par deux arginines.

Figure 56 :

25 Représentation de l'hydrophobicité (Kyte et Doolittle) de la séquence du polypeptide M1C25 de séquence d'acides aminés SEQ ID N° 30.

Figure 57 :

30

A- Gel d'acrylamide (12%) en condition dénaturante d'un extrait bactérien obtenu par sonication de bactéries *E. coli* M15 contenant le plasmide pM1C25 sans et après 4 heures d'induction par l'IPTG, coloré au bleu de Comassie.

35

ligne 1: Marqueur de masse molaire (Prestained SDS-PAGE Standards High Range BIO-RAD®).

5 ligne 2: Extrait bactérien obtenu par sonication de bactéries *E. coli* M15 contenant le plasmide pM1C25 sans induction par l'IPTG.

10 ligne 3: Extrait bactérien obtenu par sonication de bactéries *E. coli* M15 contenant le plasmide pM1C25 après 4 heures d'induction par l'IPTG.

ligne 4: Marqueur de masse molaire (Prestained SDS-PAGE Standards Low Range BIO-RAD®).

15

B- Western blot d'un gel semblable gel (acrylamide 12%) révélé grâce à l'anticorps penta-His commercialisé par la société Quiagen.

20 ligne 1: représentation du marqueur de masse molaire (Prestained SDS-PAGE Standards High Range BIO-RAD®).

25 ligne 2: extrait bactérien obtenu par sonication de bactéries *E. coli* M15 contenant le plasmide pM1C25 sans induction par l'IPTG.

30 ligne 3: extrait bactérien obtenu par sonication de bactéries *E. coli* M15 contenant le plasmide pM1C25 après 4 heures d'induction par l'IPTG.

30

ligne 4: représentation du marqueur de masse molaire (Prestained SDS-PAGE Standards Low Range BIO-RAD®)

35 La bande présente très majoritairement dans les lignes correspondant aux bactéries induites par l'IPTG par rapport à celles non induites par l'IPTG, comprise entre 34200 et

28400 daltons, correspond à l'expression de l'insert M1C25 cloné dans le vecteur pQE-60 (Qiagen®).

5 En ce qui concerne les légendes des autres figures qui sont numérotées par un caractère alphanumérique, chacune de ces autres figures représente la séquence nucléotidique et la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID dont la numérotation est identique au caractère alphanumérique de
10 chacune desdites figures.

Les numérotations alphanumériques des figures représentant les SEQ ID comportant un nombre suivi d'une lettre ont les significations suivantes :

- les numérotations alphanumériques présentant le même
15 nombre concernant une même famille de séquence rattachées à la séquence de référence SEQ ID dont la numérotation présente ce même nombre et la lettre A ;
- les lettres A, B et C pour une même famille de séquences distinguent les trois phases de lecture possibles de la
20 séquence nucléotidique SEQ ID de référence (A) ;
- les lettres indexées par un prime (') signifient que la séquence correspond à un fragment de la séquence SEQ ID de référence (A) ;
- la lettre D signifie que la séquence correspond à la
25 séquence du gène prédit par Cole et al., 1998 ;
- la lettre F signifie que la séquence correspond à la phase ouverte de lecture (ORF pour "Open Reading Frame") contenant la séquence "D" correspondante d'après Cole et al., 1998 ;
- 30 - la lettre G signifie que la séquence est une séquence prédite par Cole et al., 1998, et présentant une homologie de plus de 70% avec la séquence SEQ ID de référence (A) ;
- la lettre H signifie que la séquence correspond à la phase ouverte de lecture contenant la séquence "G"
35 correspondante d'après Cole et al., 1998 ;
- la lettre R signifie que la séquence correspond à une séquence prédite par Cole et al., 1998, en amont de la

séquence "D" correspondante et pouvant être en phase avec la séquence "D" en raison d'erreurs de séquençage possibles ;

- la lettre P signifie que la séquence correspond à la phase ouverte de lecture contenant la séquence "R" correspondante ;
- la lettre Q signifie que la séquence correspond à une séquence contenant les séquences "F" et "P" correspondantes.

En ce qui concerne la famille de séquences SEQ ID N° 4, l'insert précédent *phoA* contient deux fragments non contigus sur le génome, SEQ ID 4J et SEQ ID 4A, et donc issus d'un clonage multiple permettant l'expression et l'exportation de *phoA*. Ces deux fragments non contigus, les gènes et les phases ouvertes de lecture qui les contiennent d'après Cole et al., 1998, sont importants pour l'exportation d'un polypeptide antigène :

- les lettres J, K et L distinguent les trois phases de lecture possibles de la séquence nucléotidique "J" correspondante ;
- la lettre M signifie que la séquence correspond à la séquence prédite par Cole et al., 1998, et contenant la séquence SEQ ID N° 4J ;
- la lettre N signifie que la séquence correspond à la phase ouverte de lecture contenant la séquence SEQ ID N° 4M.

En ce qui concerne la famille de séquences SEQ ID N° 45, la lettre Z signifie que la séquence correspond à la séquence d'un fragment cloné fusionné avec *phoA*.

- Enfin, en ce qui concerne la famille de séquence SEQ ID N° 41, la lettre S signifie que la séquence correspond à une séquence prédite par Cole et al., 1998 et pouvant être dans la même phase de lecture que la séquence "D" correspondante, la lettre T signifiant que la séquence correspondante contient les séquences "F" et "S" correspondantes.

EXEMPLES

Matériel et méthodes

5 Cultures bactériennes, plasmides et milieux de cultures

E. coli a été cultivé sur milieu liquide ou solide Luria-Bertani (LB). *M. smegmatis* a été cultivé sur milieu liquide Middlebrook 7H9 (Difco) additionné de dextrose albumine (ADC), 0,2 % de glycérol et 0,05 % de Tween, ou sur milieu
10 solide L. Si nécessaire, l'antibiotique kanamycine a été rajouté à une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}^{-1}$. Les clones bactériens présentant une activité PhoA ont été détectés sur de l'agar LB contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyile
15 phosphate (X-P, à 40 $\mu\text{g/ml}^{-1}$).

Manipulation d'ADN et séquençage

Les manipulations d'ADN et les analyses par
20 Southern blot ont été effectuées en utilisant les techniques standard (Sambrook et al., 1989). Les séquences d'ADN double brin ont été déterminées avec un kit de séquençage Taq Dye Deoxy Terminator Cycle (Applied Biosystems), dans un Système 9600 GeneAmp PCR (Perkin-
25 Elmer), et après migration sur un système d'analyse ADN modèle 373 (Applied Biosystems).

Constructions des plasmides

30 Le plasmide pJVEDa a été construit à partir de pLA71, plasmide de transfert comportant le gène *phoA* tronqué et placé en phase avec *BlaF*. pLA71 a été coupé avec les enzymes de restriction KpnI et NotI, retirant ainsi *phoA* sans toucher le promoteur de *BlaF*. Le gène *luc* codant
35 pour la luciférase de luciole a été amplifié à partir de

pGEM-luc et un site de liaison du ribosome a été rajouté. *phoA* a été amplifié à partir de pJEM11. Les fragments amplifiés ont été coupés avec *Pst*I et ligaturés ensemble.

Les oligodéoxynucléotides utilisés sont les suivants :

5 pPV.luc.Fw : 5'GACTGCTGCAGAAGGAGAAGATCCAAATGG3'

luc.Bw : 5'GACTAGCGGCCCGCAATTCGTCGACCTCCGAGG3'

pJEM.phoA.Fw : 5'CCGCGGATCCGGATACGTAC3'

phoA.Bw: 5'GACTGCTGCAGTTTATTTTCAGCCCCAGAGCG3'.

Le fragment ainsi obtenu a été réamplifié en
10 utilisant les oligonucléotides complémentaires de ses extrémités, coupé avec *Kpn*I et *Not*I, et intégré dans pLA71 coupé avec les mêmes enzymes. La construction résultante a été électroporée dans *E. coli* DH5 α et *M. smegmatis* mc² 155. Un clone *M. smegmatis* émettant de la lumière et présentant
15 une activité *phoA* a été sélectionné et appelé pJVED/*bla*F. L'insert a été retiré en utilisant *Bam*HI et la construction refermée sur elle-même, reconstruisant ainsi le pJVED_a. Afin d'obtenir le pJVED_{b,c}, le multisite de clonage a été coupé avec *Sca*I et *Kpn*I et refermé en enlevant un (pJVED_b)
20 ou deux (pJVED_c) nucléotides du site *Sna*BI. Après fusion six cadres de lecture ont pu ainsi être obtenus. L'insert du pJVED/*hsp18* a été obtenu par amplification en chaîne par polymérase (ACP) de pPM1745 (Servant et al., 1995) en utilisant des oligonucléotides de la séquence :

25 18.Fw : 5'GTACCAGTACTGATCACCCGTCTCCCGCAC3'

18.Back : AGTCAGGTACCTCGCGGAAGGGTCAGTGCG3'

Le produit a été coupé avec *Kpn*I et *Sca*I, et ligaturé à pJVED_a, coupé avec les mêmes enzymes, quittant ainsi le pJVED/*hsp18*.

30

Le pJVED/P19kDa et le pJVED/erp furent construits en coupant avec *Bam*HI l'insert de pExp410 et pExp53 respectivement, et en les insérant dans le site *Bam*HI du

multisite de clonage de pJVED_a.

Mesure de l'activité phosphatase alcaline

La présence d'activité est détectée par la couleur
5 bleue des colonies croissant sur un milieu de culture contenant le substrat 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (XP), puis l'activité peut être mesurée quantitativement de manière plus précise de la façon suivante :

M. smegmatis ont été cultivés dans un milieu LB
10 additionnés de 0,05 % de Tween 80 (Aldrich) et de kanamycine (20 µg/ml- 1) à 37°C pendant 24 heures. L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée par la méthode de Brockman et Heppel (Brockman et al., 1968) dans un extrait soniqué, avec p-nitrophénylphosphate comme
15 substrat de la réaction. La quantité de protéines a été mesurée par essai Bio-Rad. L'activité phosphatase alcaline est exprimée en unité arbitraire (densité optique à 420 nm x µg de protéines- 1 x minutes- 1).

20 Mesure de l'activité luciférase

M. smegmatis a été cultivé dans un milieu LB additionné de 0,05 % de Tween 80 (Aldrich) et de kanamycine (20 µg/ml- 1) à 37°C pendant 24 heures et utilisé en pleine
25 croissance exponentielle (DO à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,8). Les aliquots de suspensions bactériennes ont été brièvement soniqués et l'extrait cellulaire a été utilisé pour mesurer l'activité de la luciférase. 25 µl de l'extrait soniqué ont été mélangés avec 100 µl de substrat
30 (système d'essai luciférase Promega) automatiquement dans un luminomètre et la lumière émise exprimée en ULR ou RLU (Unités Lumineuses Relatives). Les bactéries ont été comptées par dilutions sérielles de la suspension d'origine sur milieu agar LB kanamycine et l'activité de la
35 luciférase exprimée en ULR/µg de protéines bactériennes ou en ULR/10³ bactéries.

Construction de banques génomiques de *M. tuberculosis* et
de *M. bovis*-BCG

- 5 Les banques ont été obtenues en utilisant
essentiellement pJVED_{a,b,c} précédemment décrits.

Préparation de macrophages issus de la moelle osseuse et
infection par *M. smegmatis* recombinants

10

- Les macrophages issus de la moelle osseuse ont été
préparés comme décrits par Lang et al., 1991. En résumé,
les cellules de la moelle osseuse ont été prélevées du fémur
de souris C57BL/6 âgée de 6 à 12 semaines (Iffa-Credo,
15 France). Les cellules en suspensions ont été lavées et
resuspendues dans du DMEM enrichi avec 10 % de sérum foetal
de veau, 10 % de milieu L-cell conditionné et 2 mM de
glutamine, sans antibiotiques. 10⁶ cellules ont été
ensemencées sur des plaques 24 puits Costar à fond plat
20 dans 1 ml. Après quatre jours à 37°C dans une atmosphère
humide à 10 % de teneur en CO₂, les macrophages ont été
rincés et réincubés pendant deux à quatre jours
supplémentaires. Les cellules d'un puits contrôle ont été
lysées avec du triton x 100 à 0,1 % dans l'eau et les
25 noyaux énumérés. Environ 5 x 10⁵ cellules adhérentes ont
été comptées. Pour l'infection, *M. smegmatis* portant les
différents plasmides a été cultivé en pleine phase
exponentielle (DO_{600nm} entre 0,4 et 0,8) et dilué jusqu'à
une DO de 0,1 puis 10 fois dans un milieu pour macrophage.
30 1 ml a été ajouté à chaque puits et les plaques ont été
centrifugées et incubées quatre heures à 37°C. Après trois
lavages, les cellules ont été incubées dans un milieu
contenant de l'amykacine pendant deux heures. Après trois
nouveaux lavages, les cellules infectées adhérentes ont été
35 incubées dans un milieu macrophage pendant une nuit. Les
cellules ont ensuite été lysées dans 0,5 ml de tampon de

lyse (Promega). 100 μ l ont été soniqués et la lumière émise a été mesurée sur 25 μ m. Simultanément, les bactéries ont été énumérées par étalement sur L-agar-kanamycine (20 μ g/ml⁻¹). La lumière émise est exprimée en ULR/10³ bactéries.

Analyses des banques de données

Les séquences nucléotidiques ont été comparées à EMBL et GenBank en utilisant l'algorithme FASTA et les séquences protéiques ont été analysées par similitude grâce aux banques de données PIR et Swiss Prot en utilisant l'algorithme BLAST.

Exemple 1 : Les vecteurs pJVED

Les vecteurs pJVED (Figure 51) sont des plasmides portant un gène *phoA* tronqué de *E. coli* dépourvu de codon d'initiation, de séquence signal et de séquence régulatrice. Le site multiple de clonage (SMC) permet l'insertion de fragments des gènes codants pour d'éventuelles protéines exportées ainsi que leurs séquences de régulation. Dès lors, la protéine de fusion peut être produite et présenter une activité phosphatase alcaline si elle est exportée. Seules les fusions en phase pourront être productives. Ainsi, le SMC a été modifié de sorte que les fusions peuvent être obtenues dans six phases de lecture. En aval de *phoA*, le gène *luc* de la luciférase de luciole a été inséré. Le gène complet avec le codon d'initiation mais sans qu'aucun promoteur n'ait été utilisé devrait ainsi s'exprimer avec *phoA* comme dans un opéron synthétique. Un nouveau site de liaison des ribosomes a été inséré huit nucléotides en amont du codon d'initiation de *luc*. Deux terminateurs transcriptionnels sont présents dans les vecteurs pJVED, un en amont du SMC et un second en aval de *luc*. Ces vecteurs sont des plasmides de transfert *E.*

coli-mycobacterium avec un gène de résistance à la kanamycine comme marqueur de sélection.

phoA et *luc* fonctionnent comme dans un opéron, mais
5 l'exportation est nécessaire pour l'activité *phoA*.

Quatre plasmides ont été construits par insertion dans le SMC de fragments d'ADN d'origine diverse :

Dans la première construction nommée pJVED/*blaF*, le fragment de 1,4 kb provient du plasmide déjà décrit pLA71
10 (Lim et al., 1995). Ce fragment issu du gène β -lactamase (*blaF*) de *M. fortuitum* D216 (Timm et al., 1994) inclut le promoteur muté hyperactif, le segment codant pour 32 acides aminés de la séquence signal et les 5 premiers acides aminés de la protéine mature. Ainsi cette construction
15 inclut le promoteur le plus fort connu chez *mycobacterium* et les éléments nécessaires à l'exportation de la protéine de la fusion *phoA*. Par conséquent, on peut attendre de cette construction une forte émission de lumière et une bonne activité *phoA* (cf figures 53 et 54).

20 Dans une deuxième construction nommée pJVED/*hsp18*, un fragment de 1,5 kb a été cloné à partir du plasmide déjà décrit pPM1745 (Servant et al., 1995). Ce fragment inclut les nucléotides codants pour les dix premiers acides aminés de la protéine de choc thermique de 18 kb issue de
25 *Streptomyces albus* (heat shock protein 18, HSP 18), le site de liaison du ribosome, le promoteur et, en amont, des sites régulateurs contrôlant son expression. Cette protéine appartient à la famille de alpha-crystalline de HSP à faible poids moléculaire (Verbon et al., 1992). Son
30 homologue issu de *M. leprae*, l'antigène de 18 kDa, est déjà connu pour être induit durant la phagocytose par un macrophage murin de la lignée cellulaire J-774 (Dellagostinet al., 1995). Dans des conditions de culture standard, le pJVED/*hsp18*, montre une faible activité *luc* et
35 aucune activité *phoA* (cf figures 53 et 54).

Dans une troisième construction, nommée pJVED/P19kDa, l'insert issu de pExp410 (Lim et al., 1995) a été coupé et cloné dans le SMC de pJVED_a. Ce fragment inclut les nucléotides codants pour les 134 premiers acides aminés de la protéine connue de *M. tuberculosis* 19 kDa et de ses séquences régulatrices. Comme cela a pu être mis en évidence, cette protéine est une lipoprotéine glycosylée (Garbe et al., 1993 ; Herrmann et al., 1996). Sur les figures 53 et 54, on observe, pour cette construction, une bonne activité luc correspondant à un promoteur fort, mais l'activité *phoA* est la plus forte des quatre constructions. L'activité *phoA* élevée de cette protéine de fusion avec une lipoprotéine s'explique par le fait qu'elle reste attachée à la paroi cellulaire par son extrémité N-terminal.

Dans la quatrième et dernière construction nommée pJVED/*erp* l'insert provient de pExp53 (Lim et al., 1995) et a été cloné dans le SMC de pJVED_a. pExp53 est le plasmide initial sélectionné pour son activité *phoA* et contenant une partie du gène *erp* de *M. tuberculosis* qui code pour un antigène de 28 kDa. Ce dernier inclut la séquence signal, une partie de la protéine mature et, en amont du codon d'initiation, le site de liaison de ribosome. Le promoteur a été cartographié. Une boîte fer (iron box) putative du type *fur* est présente dans cette région et encadre la région -35 du promoteur (Berthet et al., 1995). Comme prévu (figures 53 et 54) cette construction présente une bonne émission lumineuse et une bonne activité *phoA*. Le fait que cette protéine de fusion, contrairement à la fusion avec la lipoprotéine de 19 kDa, ne semble pas attachée à la paroi cellulaire n'exclut pas que la protéine native y soit associée. De plus, l'extrémité C-terminal de *erp* est absente de la protéine de fusion.

Exemple 2 : Construction d'une banque d'ADN génomique de

M. tuberculosis dans les vecteurs pJVED_s et identification d'un des membres de ces banques, (DP428), induit au cours de la phagocytose par les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse.

5 Les différentes constructions sont testées pour leur capacité à évaluer l'expression intracellulaire des gènes identifiés par l'expression de *phoA*. Dans cet objectif, l'activité luc est exprimée en URL pour 10³ bactéries en culture axénique et/ou dans des conditions
10 intracellulaires. L'induction ou la répression suivant la phagocytose par les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse peut être évaluée convenablement par la mesure des activités spécifiques. Les résultats de deux expériences distinctes sont présentés dans le tableau 2.

15 Le plasmide pJVED/*hsp18* a été utilisé comme contrôle positif pour l'induction durant la phase de croissance intracellulaire. Bien que l'induction du promoteur par le chauffage de la bactérie à 42°C n'ait pas été concluant la phagocytose de la bactérie conduit
20 clairement à une augmentation de l'activité du promoteur. Dans toutes les expériences, l'activité luc intracellulaire a été fortement induite, augmentant de 20 à 100 fois l'activité basale initialement faible (Servant, 1995).

Le plasmide pJVED/*blaF* a été utilisé comme contrôle
25 de la modulation non spécifique au cours de la phagocytose. De faibles variations ont pu être mises en évidence, probablement dues à des changements de conditions de cultures. Quoi qu'il en soit, ces faibles variations ne sont pas comparables à l'induction observée avec le
30 plasmide pJVED/*hsp18*.

Tous les membres de la banque d'ADN ont été testés par mesure de l'activité du promoteur durant la croissance intracellulaire. Parmi eux, le DP428 est fortement induit au cours de la phagocytose (tableaux 1 et 2).

TABLEAU 1

Construction	% Récupération	URL/10 ³ bactéries extracellulaire	URL/10 ³ bactéries intracellulaire	Induction
pJVED/blaI*	0,5	1460	1727	1,2
pJVED/hsp18	0,6	8	57	7,1
pJVED/DP428	0,7	0,06	18	300
Construction	% Récupération C57BL/6 Balb/C	URL/10 ³ bactéries extracellulaire	URL/10 ³ bactéries intracellulaire C57BL/6 Balb/C	Induction C57BL/6 Balb/C
pJVED/blaI*	7 1,1	662	250 911	0,4 1,4
pJVED/hsp18	6,7 1,7	164	261 325	1,6 2
pJVED/DP428	1,6 2,1	0,08	1,25 3,3	15,6 41

5 TABLEAU 2

Construction	% Récupération	URL/10 ³ bactéries extracellulaire	URL/10 ³ bactéries intracellulaire	Induction
pJVED/blaI*	22	1477	367	0,25
pJVED/hsp18	7	0,26	6,8	26
pJVED/DP428	21	0,14	4	28

Le fragment nucléotidique codant pour la région N-terminale du polypeptide DP428 de séquence SEQ ID N° 28 est contenu dans le plasmide déposé à la CNCM sous le N° I-1818.

La totalité de la séquence codant pour le polypeptide DP428 a été obtenue comme détaillée ci-après.

Une sonde a été obtenue par PCR à l'aide des oligonucléotides de séquence SEQ ID N° 25 et SEQ ID N° 26. Cette sonde a été marquée par extension aléatoire en présence de ³²P dCTP. Une hybridation de l'ADN génomique de *M. tuberculosis* souche Mt103 préalablement digéré par l'endonucléase ScaI a été réalisée à l'aide de ladite

sonde. Les résultats de l'hybridation ont fait apparaître qu'un fragment d'ADN d'environ 1,7 kb était marqué. Du fait qu'il existe un site Scal s'étendant du nucléotide nt 984 au nucléotide nt 989 de la séquence SEQ ID N° 1, c'est-à-dire du côté 5' de la séquence utilisée comme sonde, la fin de la séquence codante est nécessairement présente dans le fragment détecté par hybridation.

L'ADN génomique de la souche Mt 103 de *M. tuberculosis*, après digestion par Scal, a subi une migration sur un gel d'agarose. Les fragments de tailles comprises entre 1,6 et 1,8 kb ont été clonés dans le vecteur pSL1180 (Pharmacia) préalablement clivé par Scal et déphosphorylé. Après transformation de *E. coli* avec les vecteurs recombinants résultants, les colonies obtenues ont été criblées à l'aide de la sonde. Le criblage a permis d'isoler six colonies hybridant avec cette sonde.

Les inserts contenus dans les plasmides des clones recombinants précédemment sélectionnés ont été séquencés, puis les séquences alignées de manière à déterminer la totalité de la séquence codant pour DP428, plus spécifiquement la SEQ ID N° 2.

Un couple d'amorces a été synthétisé afin d'amplifier, à partir de l'ADN génomique de *M. tuberculosis*, souche Mt 103, la totalité de la séquence codant pour le polypeptide DP428. L'amplicon obtenu a été cloné dans un vecteur d'expression.

Des couples d'amorces appropriés pour l'amplification et le clonage de la séquence codant pour le polypeptide DP428 peuvent être aisément réalisés par l'homme du métier, sur la base des séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

Un couple d'amorces particulier selon l'invention est le couple d'amorces suivants, capable d'amplifier l'ADN codant pour le polypeptide DP428 dépourvu de sa séquence signal :

- Amorce aller (SEQ ID N° 29), comprenant la séquence allant du nucléotide en position nt 1021 au nucléotide nt 1044 de la séquence SEQ ID N° 2 :

5' -AGTGCATGCTGCTGGCCGAACCATCAGCGAC- 3'

5

- Amorce retour (SEQ ID N° 30), comprenant la séquence complémentaire de la séquence allant du nucléotide en position nt 1345 au nucléotide en position nt 1325 de la séquence SEQ ID N° 2 :

10 5' -CAGCCAGATCTGCGGGCGCCCTGCACCGCCTG- 3',

dans lesquelles la partie soulignée représente les séquences hybridant spécifiquement avec la séquence SEQ ID N° 2 et les extrémités 5' correspondent à des sites de restriction en vue du clonage de l'amplicon résultant dans un vecteur de clonage et/ou d'expression.

15

Un vecteur particulier utilisé pour l'expression du polypeptide DP428 est le vecteur pQE70 commercialisé par la société Qiagen.

20

Exemple 3 : La séquence complète du gène DP428 et de ses régions flanquantes.

Une sonde de la région codante de DP428 a été obtenue par ACP, et utilisée pour hybrider l'ADN génomique de différentes espèces de mycobactéries. D'après les résultats de la figure 3, le gène est présent uniquement dans les mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis*.

25

L'analyse de la séquence suggère que DP428 pourrait faire partie d'un opéron. La séquence codante et les régions flanquantes ne présentent aucune homologie avec des séquences connues déposées dans les banques de données.

30

D'après la séquence codante, ce gène code pour une protéine de 10 kDa avec un peptide signal, une extrémité C-terminal hydrophobe terminée par deux arginines et précédée par un motif LPISG semblable au motif connu LPXTG. Ces deux

35

arginines pourraient correspondre à un signal de rétention et la protéine DP428 pourrait être accrochée par ce motif à des peptidoglycanes comme cela a déjà été décrit chez d'autres bactéries Gram⁺ (Navarre et al., 1994 et 1996).

5 Le mécanisme de survie et de croissance intracellulaire des mycobactéries est complexe et les relations intimes entre la bactérie et la cellule hôte restent inexpliquées. Quel que soit le mécanisme, la croissance et la survie intracellulaire des mycobactéries
10 dépend de facteurs produits par la bactérie et capables de moduler la réponse de l'hôte. Ces facteurs peuvent être des molécules exposées à la surface cellulaire telle que LAM ou des protéines associées à la surface cellulaire, ou des molécules activement secrétées.

15 D'un autre côté, intracellulairement, les bactéries elles-mêmes doivent faire face à un environnement hostile. Elles semblent y répondre par des moyens proches de ceux mis en oeuvre dans les conditions de stress, par l'induction de protéines de choc thermique (Dellagostin et
20 al., 1995), mais aussi par induction ou la répression de différentes protéines (Lee et al., 1995). En utilisant une méthodologie dérivée de la PCR, Plum et Clark-curtiss (Plum et al., 1994) ont montré qu'un gène de *M. avium* inclu dans un fragment d'ADN de 3 kb, est induit après la phagocytose
25 par des macrophages humains. Ce gène code pour une protéine exportée comprenant une séquence leader mais ne présentant pas d'homologie significative avec les séquences proposées par les banques de données. L'induction, pendant la phase de croissance intracellulaire, d'une protéine de choc
30 thermique de faible poids moléculaire issue de *M. leprae* a également été mise en évidence (Dellagostin et al., 1995). Dans une autre étude, les protéines bactériennes de *M. tuberculosis* ont été métaboliquement marquées pendant la phase de croissance intracellulaire ou bien dans des
35 conditions de stress et séparées par électrophorèse sur gel à deux dimensions : 16 protéines de *M. tuberculosis* ont été

induites et 28 réprimées. Les mêmes protéines sont mises en jeu au cours de stress provoqué par un faible pH, un choc thermique, H₂O₂, ou au cours de la phagocytose par des monocytes humains de la lignée THP1. Quoi qu'il en soit, le comportement des protéines induites et réprimées était unique dans chaque condition (Lee et al., 1995). Pris ensemble, ces résultats indiquent qu'un dialogue moléculaire subtile est mis en place entre les bactéries et leurs hôtes cellulaires. De ce dialogue dépend probablement le sort de l'organisme intracellulaire.

Dans ce contexte, l'induction de l'expression de DP428 pourrait être d'une importance majeure, indiquant un rôle important de cette protéine dans la survie et la croissance intracellulaire.

La méthode utilisée dans ces expériences pour évaluer l'expression intracellulaire des gènes (cf. Jacobs et al., 1993, pour la méthode de détermination de l'expression de la luciférase de luciole, et Lim et al., 1995, pour la méthode de détermination de l'expression du gène *PhoA*) présente l'avantage d'être simple comparée aux autres techniques comme la technique décrite par Mahan et al. (Mahan et al., 1993) adaptée aux mycobactéries et proposée par Bange et al. (Bange et al., 1996), ou la méthode substructive basée sur l'ACP décrite par Plum et Clark-curtiss (Plum et al., 1994). Il existe indiscutablement une variabilité comme le montre la comparaison des différentes expériences. Bien que provoquer l'induction ou la répression soit suffisant, il est désormais possible de l'évaluer fournissant ainsi un outil supplémentaire d'études physiologiques des protéines exportées identifiées par fusion avec *phoA*.

Exemple 4 :

Recherche d'une modulation de l'activité des promoteurs lors des phases intramacrophagiques.

Des macrophages de moelle osseuse de souris sont préparés comme décrit par Lang et Antoine (Lang et al., 1991). Les bactéries de *M. segmentis* recombinantes, dont on a déterminé l'activité luciférase par 10^3 bactéries comme
5 précédemment, sont incubées à 37°C sous atmosphère humidifiée et enrichie en CO₂ à 5%, pendant 4 heures en présence de ces macrophages de telle manière qu'elles soient phagocytées. Après rinçage pour éliminer les bactéries extracellulaires restantes, on ajoute au milieu
10 de culture de l'amikacine (100 µg/ml) pendant deux heures. Après un nouveau rinçage, le milieu est remplacé par un milieu de culture (DMEM enrichi de 10 % de sérum de veau et 2 mM de glutamine) sans antibiotiques. Après une nuit d'incubation comme précédemment, les macrophages sont lysés
15 à froid (4°C) à l'aide d'un tampon de lyse (cee lysis buffer, Promega), et l'activité luciférase par 10^3 bactéries déterminée. Le rapport des activités à la mise en culture et après une nuit donne le coefficient d'induction.

20 Exemple 5 :

Isolement d'une série de séquences par séquençage directement à partir des colonies.

Une série de séquences permettant l'expression et
25 l'exportation de *phoA* ont été isolées à partir de l'ADN de *M. Tuberculosis* ou de *M. Bovis* BCG. Parmi ce groupe de séquences, deux d'entre elles ont été d'avantage étudiées, les gènes entiers correspondant aux inserts ont été clonés, séquencés, et des anticorps contre le produit de ces gènes
30 ont servi à montrer en microscopie électronique que ces gènes codaient pour des antigènes retrouvés à la surface des bacilles de la tuberculose. L'un de ces gènes *erp* codant pour une séquence signal d'exportation consensus, l'autre *des* ne possédait aucune caractéristique de gène
35 codant pour une protéine exportée, d'après la séquence. Un

autre gène DP428 a été séquencé avant que la séquence du génome de *M. Tuberculosis* ne soit disponible. Il contient une séquence ressemblant à la séquence consensus d'attachement au peptidoglycane, ce qui suggère qu'il s'agit aussi d'un antigène vraisemblablement retrouvé à la surface des bacilles de la tuberculose. L'étude des trois gènes *erp*, *des*, et celui codant pour DP428 montre que le système *phoA* que nous avons développé chez les mycobactéries permet de repérer des gènes codant pour des protéine exportées sans déterminant repérable par des études *in silico*. Ceci est particulièrement vrai pour les polypeptides qui ne possèdent pas de séquence signal consensus (*des*) ou non pas de similarité avec des protéines de fonction connue (*erp* et DP428).

15

Un certain nombre d'inserts ont été identifiés et séquencés avant la connaissance du génome de *M. Tuberculosis*, d'autres après. Ces séquences peuvent être considérées comme des amorces permettant de rechercher des gènes codant pour des protéines exportées. A ce jour, une série d'amorces ont été séquencées et les gènes entiers correspondants ont été soit séquencés, soit identifiés d'après la séquence publiée du génome. Pour tenir compte des erreurs de séquençage toujours possibles, les régions en amont ou en aval de certaines amorces ont été considérées comme pouvant faire partie de séquences codant pour des protéines exportées. Dans certains cas des similarités avec des gènes codant pour des protéines exportées ou des séquences caractéristiques de signaux d'exportation ou des caractéristiques topologiques de protéines membranaires ont été détectées.

25
30

Des séquences amorces s'avèrent correspondre à des gènes appartenant à des familles de gènes possédant plus de 50 % de similarité. On peut ainsi indiquer que les autres gènes détectés par similarité avec une amorce codent pour

35

des protéines exportées. C'est le cas de la séquence SEQ ID N° 8G et SEQ ID N° 8H possédant plus de 77 % de similarité avec SEQ ID N° 8A'.

Les séquences pouvant coder pour des protéines exportées sont les suivantes : SEQ ID N° 1, 8, 9, 8G, 8H, 13, 3, 10, 19, 20, 6, 16, 22, 23, 24, 39, 44, 46, et 50.

Des gènes identifiés d'après les amorces à partir de la séquence du génome n'ont aucune caractéristique (d'après la séquence) de protéines exportées. Il s'agit des séquences suivantes : SEQ ID N° 4, 27, 11, 12, 14, 7, 15, 17, 18, 21, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 48, et 49.

D'après la séquence d'autres organismes comme *E. coli*, on peut rechercher dans la séquence du génome de *M. tuberculosis*, des gènes possédant des similarités avec des protéines connues pour être exportées chez d'autres organismes bien que ne possédant pas de séquence signal d'exportation. Dans ce cas une fusion avec *phoA* est un protocole avantageux pour déterminer si ces séquences de *M. tuberculosis* codent pour des protéines exportées bien que ne présentant pas de séquence signal consensus. Il a été en effet possible de cloner SEQ ID N° 49, une séquence similaire à un gène de *E. coli* de la famille *htrA*. Une fusion de SEQ ID N° 49 avec *phoA* conduit à l'expression et à l'exportation de *phoA*. Des colonies *M. smegmatis* hébergeant une fusion SEQ ID N° 49 *phoA* sur un plasmide pJVED sont bleues.

SEQ ID N° 49 est donc considérée comme une protéine exportée.

La méthode *phoA* est donc utile pour détecter d'après la séquence de *M. Tuberculosis* des gènes codant pour des protéines exportées sans qu'ils ne codent pour des séquences caractéristiques des protéines exportées.

Même si une séquence possède des déterminants de protéines exportées, cela ne démontre pas une exportation fonctionnelle. Le système *phoA* permet de montrer que le gène suspecté code réellement pour une protéine exportée.

- 5 Ainsi, il a été vérifié que la séquence SEQ ID N° 50 possédait bien des signaux d'exportation.

TABLEAU 3

SEQ ID N°	Référence de la séquence correspondante prédite par Cole et al.		Annotation
SEQ ID N°1	Rv 0203	*	Séquence hydrophobe en N-terminal
SEQ ID N°4			
SEQ ID N°27	Rv 2050		Pas de prédiction
SEQ ID N°8			
SEQ ID N°9	Rv 2563	*	Protéine membranaire
SEQ ID N°8G', H'	Rv 0072	*	Possible protéine de transport transmembranaire de type ABC
SEQ ID N°11	Rv 0546c	ML	Protein S-D Lactoyl Glutathione-méthyl glyoxal lyase
SEQ ID N°12	pas de prédiction		non retrouvé dans <i>M. tuberculosis</i> H37rv
SEQ ID N°13			
SEQ ID N°3	Rv 1984c	*	probable précurseur cutinase avec une séquence signal N-terminale
SEQ ID N°10			
SEQ ID N°14			
SEQ ID N°7	pas de prédiction		pas de prédiction
SEQ ID N°15	avec décalage de lecture, pourrait être en phase avec Rv 2530c		pas de prédiction
SEQ ID N°17	Rv 1303	ML	pas de prédiction
SEQ ID N°18	Rv 0199	ML	pas de prédiction
SEQ ID N°19	Rv 0418	*	site de fixation de lipo-protéine membranaire procaryote, similarité avec la N-acétyl puromycine acétyl hydrolase
SEQ ID N°20	Rv 3576	*	contient un site de fixation de lipoprotéine membranaire procaryote, similarité avec une
SEQ ID N°6			

			sérine/thréonine protéine kinase
SEQ ID N° 21	Rv 3365c	ML	similarité avec une métallo peptidase à zinc
SEQ ID N° 31	non prédite		pas de prédiction
SEQ ID N° 32	Rv 0822c	ML	Existence d'une région consensus avec la famille drac
SEQ ID N° 33	Rv 1044		pas de prédiction
SEQ ID N° 34	non prédite		pas de prédiction
SEQ ID N° 35	Rv 2169c		pas de prédiction
SEQ ID N° 36	Rv 3909	ML	pas de prédiction
SEQ ID N° 37	Rv 2753c		similarité avec des dihydropricolinate synthases
SEQ ID N° 38	Rv 0175		pas de prédiction
SEQ ID N° 39	Rv 3006	ML	prédiction de séquence signal de lipoprotéine
SEQ ID N° 40	Rv 0549c		pas de prédiction
SEQ ID N° 41	Rv 2975c pouvant être en phase avec Rv 2974c		similarité avec protéine de substilis
SEQ ID N° 42	Rv 2622		similarité avec une méthyl transférase
SEQ ID N° 43	Rv 3278c	ML	pas de prédiction
SEQ ID N° 44	Rv 0309	*	pas de prédiction
SEQ ID N° 45	Rv 2169c	ML	pas de prédiction
SEQ ID N° 46	Rv 1411c	*	probable lipoprotéine avec une séquence signal N-terminale
SEQ ID N° 47	Rv 1714		similarité avec une gluconate 3-déhydrogénase
SEQ ID N° 48	Rv 0331		similarité avec une sulfide déhydrogénase et une sulfide quinone réductase
SEQ ID N° 49	Rv 0983	ML	Similarité avec une sérine protéase HtrA

SEQ ID N°5			
SEQ ID N°16	Rv 3810	* ML	Protéine de surface Berthelet et al. 1995
SEQ ID N°22 SEQ ID N°23 SEQ ID N°24	Rv 3763	*	Contient un site de fixation de lipoprotéine membranaire eucaryote
SEQ ID N°50	Rv 0125	*	Site actif des sérines protéases Séquence signal N-terminale possible

Légende du tableau 3 :

Correspondance des séquences selon l'invention avec les
séquences prédites par Cole et al. 1998, Nature, 393, 537-
544.

* : Prédiction que la protéine codée par la séquence
soit exportée

ML : Prédiction de similarité avec *M. leprae*.

10 Exemple 6 :

Caractéristiques et obtention de la protéine M1C25

L'extrémité N terminale de la protéine M1C25 a été
détectée par le système *PhoA* comme permettant l'exportation
de la protéine de fusion, nécessaire à l'obtention de son
activité phosphatase.

La séquence d'ADN codant pour l'extrémité N terminale de
la protéine M1C25 est contenue dans la séquence SEQ ID N°
20 de la présente demande de brevet.

A partir de cette séquence amorce, le gène complet
codant pour la protéine M1C25 a été recherché dans le
génom de *M. tuberculosis* (Fondation Wellcome Trust, site
Sanger).

Le centre Sanger a attribué à M1C25 les noms:

Rv3576,
MTCY06G11.23,
pknM

- 5 Séquence SEQ ID N° 29 du gène complet M1C25 (714 bases):
cf. Figure 29

Ce gène code pour une protéine de 237 AA, de 25 kDa de
masse molaire. Cette protéine est référencée dans les
10 banques sous les appellations:
PID:e306716,
SPTREMBL:P96858

- 15 Séquence SEQ ID N° 30 de la protéine M1C25 (237 acides
aminés): cf. Figure 30

M1C25 contient un site de fixation à la partie
lipidique des lipoprotéines de membrane des procaryotes
(PS00013 Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment
20 site:
CTGGTCGGTG CGTGCGATGCT CGCAGCCGGA TGC).

La fonction de M1C25 n'est pas certaine mais elle
possède très probablement une activité "sérine/thréonine-
protéine kinase". Des ressemblances sont à noter avec la
25 moitié C terminale de K08G_MYCTU Q11053 Rv1266c
(MTCY50.16). Des similarités sont aussi retrouvées avec
KY28_MYCTU.

En 5' du gène codant pour M1C25 se trouve un gène
codant potentiellement pour une protéine régulatrice
30 (PID:e306715, SPTREMBL:P96857, Rv3575c, (MTCY06G11.22c))

Le profil d'hydrophobicité (Kyte et Doolittle) de M1C25
est représenté à la figure 56.

Un site de clivage de la séquence signal est prédit
(SignalP V1.1; World Wide Web Prediction Server, Center for
35 Biological Sequence Analysis) entre les acides aminés 31 et
32: AVA-AD. Ce site de coupure est derrière un motif "AXA"
classique. Cette prédiction est compatible avec le profil

d'hydrophobicité. Dans cette séquence signal potentielle il est a remarqué la répétition trois fois de la séquence des trois acides aminés LAA.

- 5 Clonage du gène M1C25 en vue de la production de la protéine qu'il code:

Un couple d'amorces a été synthétisé afin d'amplifier, à partir de l'ADN génomique de M. tuberculosis, souche
10 H37Rv, la totalité de la séquence codant pour le polypeptide M1C25. L'amplicon obtenu a été cloné dans un vecteur d'expression.

Des couples d'amorces appropriés pour l'amplification
15 et le clonage de la séquence codant pour M1C25 ont été synthétisés :

-amorce aller :

5' -ATAATACCATGGGCAAGCAGCTAGCCGCGC- 3'

-amorce retour :

20 5' -ATTTATAGATCTCTGCTTAGCAACCTTGGCCGCG- 3'

La partie soulignée représente les séquences hybridant spécifiquement avec la séquence M1C25 et les extrémités 5' correspondent à des sites de restriction en vue du clonage
25 de l'amplicon résultant dans un vecteur de clonage et/ou d'expression.

Un vecteur particulier utilisé pour l'expression du polypeptide M1C25 est le vecteur pQE60 commercialisé par la société Qiagen, en suivant le protocole et les
30 recommandations proposés par cette marque.

Les cellules utilisées pour le clonage sont des bactéries : E. coli XL1-Blue (résistante à la tétracycline).

Les cellules utilisées pour l'expression sont des
35 bactéries : E. coli M15 (résistante à la kanamycine) contenant le plasmide pRep4 (M15 pRep4).

La production de la protéine MC25 est illustrée par les figures 57 A et B. (Extraits bactériens de la souche E. coli M15 contenant le plasmide pM1C25. Les cultures bactériennes et les extraits sont préparés selon Sambrook et al. (1989). L'analyse des extraits bactériens est effectuée selon les instructions de Quiagen (1997).

Références bibliographiques

- AIDS therapies, 1993, in *Mycobacterial infections*, ISBN 0-9631698-1-5, pp. 1-11.
- 5 Altschul, S.F. et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 215 : 403-410.
- Andersen, P. et al., 1991, *Infect. Immun.*, 59 :1905-1910.
- Andersen, P. et al., 1995, *J. Immunol.*, 154, 3359-3372.
- Bange, F.C., A.M. Brown, and W.R. Jacobs JR., 1996, Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in
- 10 macrophages. *Infect. Immun.*, 64,: 1794-1799.
- Barany, F., 1911, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :189-193.
- Bates, J. et al., 1986, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134 :415-417.
- Bates, J. 1979. *Chest*. 76(Suppl.):757-763.
- 15 Bates, J. et al.. 1986. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134 :415-417.
- Berthet, F.X., J. Rauzier, E.M. Lim, W. Philipp, B. Gicquel, and D. Portnoï, 1995, Characterization of the *M. tuberculosis* *erp* gene encoding a potential cell surface protein with repetitive structures. *Microbiology*. In press
- 20 Borremans, M. et al., 1989, *Biochemistry*, 7 : 3123-3130.
- Bouvet, E. 1994. *Rev. Fr. Lab.* 273 :53-56.
- Brockman, R.W. and Heppel L.A., 1968, On the localization of alkaline phosphatase and cyclic phosphodiesterase in *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 7 : 2554-2561.
- 25 Burg, J.L. et al., 1996, *Mol. and Cell. Probes*, 10 :257-271.
- Chevrier, D. et al., 1993, *Mol. and Cell. Probes*, 7 :187-197.
- Clemens, D.L., 1996, Characterization of the *Mycobacterium*
- 30 *tuberculosis* phagosome, *Trends Microbiol.*, 4 : 113-118.
- Chu ,B.C.F. et al., 1986, *Nucleic Acids Res.*, 14 :5591-5603.

- Clemens, D.L. and Horwitz M.A., 1995, Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited, J. Exp. Med., 181 : 257-270.
- 5 Colignon J.E., 1996. Immunologic studies in humans. Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. Current Protocols in Immunology, NIH, 2, Section II.
- Daniel, T.M. et al. 1987. Am. Rev. Respir. Dis., 135 :1137-10 1151).
- Dellagostin, O.A., Esposito G., Eales L.-J., Dale J.W. and. McFadden J.J., 1995, Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. Microbiol., 141 : 2123-2130.
- 15 Drake, T.A. et al. 1987. J. Clin. Microbiol. 25:1442-1445.
- Dramsı et al., 1997, Infection and Immunity, 65, 5 : 1615-1625.
- Duck, P. et al., 1990, Biotechniques, 9:142-147.
- Erlich, H.A. 1989. In PCR Technology. Principles and 20 Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press.
- Felgner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 84:7413.
- Fraley et al., 1980, J. Biol. Chem., 255:10431.
- Gaillard, J.L., Berche P., Frehel C., Gouin E. and Cossart 25 P., 1991, Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci, Cell., 65 : 1127-1141.
- Garbe, T., Harris D., Vordermeir M., Lathigra R., Ivanyi J. and Young D., 1993, Expression of the *Mycobacterium* 30 *tuberculosis* 19-kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: immunological analysis and evidence of glycosylation, Infect. Immun., 61 : 260-267.

- Guateli, J.C. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878.
- Harboe et al., 1996, Infect. Immun., 64, 16-22.
- Herrmann, J.L., O'Gaora P., Gallagher A., Thole J.E.R. and
- 5 Young D.B., 1996, Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*, EMBO J. 15 : 3547-3554.
- Houbenweyl, 1974, in Meuthode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volume 15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart.
- 10 Huygen, K. et al., 1996, Nature Medicine, 2(8):893-898.
- Innis, M.A. et al. 1990. in PCR Protocols. A guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press.
- Isberg, R.R., Voorhis D.L. and Falkow S., 1987, Identification of invasins: a protein that allows enteric
- 15 bacteria to penetrate cultured mammalian cells, Cell, 50 : 769-778.
- Jacobs, W.R. et al., 1991. Construction of mycobacterial genomic libraries in shuttle cosmids. Genetic Systems for *Mycobacteria*, Methods in Enzymology, 204 : 537-555.
- 20 Jacobs, W.R. et al., 1993, Science, 260 :819-822.
- Kaneda, et al., 1989, Science, 243:375
- Kiehn, T.E., et al. 1987. J. Clin. Microbiol. 25 :1551-1552.
- Kievitis ,T. et al., 1991, J. Virol. Methods, 35 :273-286.
- 25 Kohler, G. et al., 1975, Nature, 256(5517):495-497.
- Kwoh, D.Y. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 :1173-1177.
- Landegren ,U. et al., 1988, Science, 241,:1077-1080.
- Lang, T. and Antoine J.-C., 1991, Localization of MHC
- 30 classII molecules in murine bone marrow-derived macrophages. Immunology, 72 : 199-205.

- Lee, B.Y. and Horwitz M.A., 1995, Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Invest., 96 : 245-249.
- Lim, E.M., Rauzier J., Timm J., Torrea G., Murray A.,
5 Gicquel B. and Portnoï D., 1995, Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins, using *phoA* gene fusions, J. Bacteriol., 177 : 59-65.
- Lizardi, P.M. et al., 1988, Bio/technology, 6 :1197-1202.
- 10 Mahan, M.J. et al., 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues, Science, 259 : 686-688.
- Manoil L., Mekolanos J.J. and Beckwith J., J. Bacteriol., 1990, 172, 515-518.
- 15 Matthews, J.A. et al., 1988, Anal. Biochem., 169:1-25.
- Merrifield, R.D., 1966, J. Am. Chem. Soc., 88(21):5051-5052.
- Midoux, 1993, Nucleic Acids Research, 21:871-878/
- Miele, E.A. et al., 1983, J. Mol. Biol., 171:281-295.
- 20 Minton, N.P., 1984, Gene, 31, 269-273.
- Montgomery et al., 1993, DNA Cell Biol., 12:777-783.
- Navarre, W.W. et al., 1994, Molecular Microbiologie, 14(1):115-121.
- Navarre, W.W. et al., 1996, J. of Bacteriology, 178, 2 :441-
25 446.
- Pagano et al., 1967, J. Virol., 1 :891
- Pastore, 1994, Circulation, 90:I-517.
- Patel, et al. 1990. J. Clin. Microbiol. :513-518.
- Prentki, B. et Krish H.M., 1984, Gene, 29 : 303-313.
- 30 Pettersson R., Nordfelth J., Dubinina E., Bergman T., Gustafsson M., Magnusson K.E. and Wolf-Watz H., 1996,

- Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science.*, 273 : 1231-1233.
- Plum, G. and Clark-Curtiss J.E., 1994, Induction of *Mycobacterium avium* gene expression following phagocytosis by human macrophages. *Infect. Immun.*, 62 : 476-483.
- Roberts, M.C., et al. 1987. *J. Clin. Microbiol.* 25, :1239-1243.
- Rolfs, A. et al. 1991. In *PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sambrook, J. et al. 1989. In *Molecular cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Pescador, R., 1988, *J. Clin. Microbiol.*, 26(10), :1934-1938.
- Schneewind, O. et al., 1995, *Science*, 268 : 103-106.
- Segev D., 1992, in « Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules ». Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.
- Servant, P. and Mazodier P., 1995, Characterization of *Streptomyces albus* 18-kilodalton heat shock-responsive protein. *J. Bacteriol.*, 177 : 2998-3003.
- Shiver, J.W., 1995, in *Vaccines 1995*, eds Chanock, R.M. Brown, F. Ginsberg, H.S. & Norrby, E.), pp.95-98, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sorensen et al., 1995, *Infect. Immun.*, 63, 1710-1717.
- Stone, B.B. et al., 1996, *Mol. and Cell. Probes*, 10 :359-370.
- Stover, C.K., Bansal G.P., Hanson M.S., Burlein S.R., Palaszynski S.R., Young J.F., Koenig S., Young D.B., Sadziene A. and Barbour A.G., 1993, Protective immunity elicited by recombinant Bacille Calmette-Guerin (BCG)

- expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. J. Exp. Med., 178 : 197-209.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger P.H., Chakroborty P.,
5 Haddix P.L., Collins H.L., Fok A.K., Allen R.D., Gluck S.L., Heuser J. and Russell D.G., 1994, Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science., 263 : 678-681.
- Tascon, R.E et al., 1996, Nature Medicine, 2(8):888-892.
- 10 Technique assemblage oligonucléotides, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 :7461-7465.
- Technique des bêta-cyanethylphosphoramidites, 1986, Bioorganic Chem., 4 :274-325.
- Thierry, D. et al., 1990, Nucl. Acid Res., 18 :188.
- 15 Timm, J., Perilli M.G., Duez C., Trias J., Orefici G., Fattorini L., Amicosante G., Oratore A., Boris B., Frere J.M., Pugsley A.P. and Gicquel B., 1994, Transcription and expression analysis, using *lacZ* and *phoA* gene fusions, of *Mycobacterium fortuitum* B-lactamase genes cloned from a
20 natural isolate and a high-level B-lactamase producer. Mol. Microbiol., 12 : 491-504.
- Tuberculosis Prevention Trial, 1980, Mendis, « Trial of BCG vaccines in South India for Tuberculosis Infection », Indian Journal of Medical research, 1972 (Suppl.):1-74.
- 25 Urdea, M.S. et al., 1991, Nucleic Acids Symp. Ser., 24 :197-200.
- Urdea, M.S., 1988, Nucleic Acids Research, 11: 4937-4957.
- Verbon, A., Hartskeerl R.A., Schuitema A., Kolk A.H., Young D.B. and Lathigra R., 1992, The 14,000-molecular-weight
30 antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins. J Bacteriol., 174 : 1352-1359.

Walker, G.T. et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20:1691-1696.

Walker, G.T. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:392-396.

5 Wiker, H.G. et al., 1992, Microbiol. Rev., 56 :648-661.

Yamaguchi, R. et al., 1989, Infect. Immun., 57 :283-288 ;

Xu, S., Cooper A., Sturgill-Koszycki S., van Heyningen T.,

Chatterjee D., Orme I., Allen P. and Russel D.G., 1994,

Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and

10 *Mycobacterium avium*-infected macrophages, J. Immuno., 153: 2568-2578.

Young, D.B. et al., 1992, Mol. Microbiol., 6 :133-145.

Yuen, L.K.W. et al., 1993, J. Clin. Microbiol., 31 : 1615-1618.

REVENDICATIONS

1. Vecteur recombinant de criblage, de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il se réplique chez des mycobactéries et en ce qu'il contient :
- 5
- 1) un réplicon fonctionnel chez les mycobactéries ;
 - 2) un marqueur de sélection ;
 - 3) une cassette rapporteur comprenant :
 - a) un site de clonage multiple (polylinker),
 - 10 b) éventuellement un terminateur de transcription actif chez les mycobactéries, en amont du polylinker,
 - c) une séquence nucléotidique codante issue d'un gène codant pour un marqueur d'expression, d'exportation et/ou de sécrétion de protéine, ladite séquence nucléotidique
 - 15 étant dépourvue de son codon d'initiation et de ses séquences de régulation, et
 - d) une séquence nucléotidique codante issue d'un gène codant pour un marqueur d'activité de promoteurs contenus dans le même fragment, ladite séquence nucléotidique étant
 - 20 pourvue de son codon d'initiation.
2. Vecteur recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codante issue d'un gène codant pour un marqueur d'expression, d'exportation et/ou de sécrétion de protéine est une
- 25
- séquence codante issue du gène *phoA* de la phosphatase alcaline.
3. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 et
- 30
- 2, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codante issue d'un gène codant pour un marqueur d'expression, d'exportation et/ou de sécrétion de protéine est une séquence codante du gène de la β -agarase, de la nucléase d'un staphylocoque ou de la β -lactamase d'une mycobactérie.

4. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codante issue d'un gène codant pour un marqueur d'activité de promoteurs contenus dans le même fragment est une séquence
5 codante issue du gène *luc* de la luciférase de luciole.
5. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codante issue d'un gène codant pour un marqueur d'activité de
10 promoteurs contenus dans le même fragment est une séquence codante issue du gène *GFP* de la Green Fluorescent Protein.
6. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le terminateur de transcription
15 actif chez les mycobactéries est le terminateur du coliphage T4 (*tT4*).
7. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est un plasmide choisi parmi les
20 plasmides suivants déposés à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Paris, France) :
- a) pJVEDa déposé à la CNCM sous le N° I-1797, le 12/12/1996,
b) pJVEDb déposé à la CNCM sous le N° I-1906, le 25 juillet
25 1997,
c) pJVEDc déposé à la CNCM sous le N° I-1799, le 12/12/1996.
8. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à
30 7, caractérisé en ce qu'il comprend en l'un des sites de clonage du polylinker une séquence d'acide nucléique de mycobactérie chez laquelle on détecte un polypeptide susceptible d'être exporté et/ou sécrété, et/ou d'être induit ou réprimé lors de l'infection par ladite
35 mycobactérie ou encore exprimé ou produit de façon constitutive, ainsi que les séquences promotrices et/ou régulatrices associées susceptibles de permettre ou de

favoriser l'exportation et/ou la sécrétion dudit polypeptide, ou tout ou partie de gène codant pour ledit polypeptide.

- 5 9. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique de mycobactérie qu'il contient est obtenue par fragmentation physique ou par digestion enzymatique de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire d'un ARN d'une mycobactérie.
- 10 10. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ladite mycobactérie est *M. tuberculosis*.
- 15 11. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ladite mycobactérie est choisie parmi *M. africanum*, *M. bovis*, *M. avium* ou *M. leprae*.
- 20 12. Vecteur recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est un plasmide choisi parmi les plasmides suivants déposés à la CNCM :
- a) p6D7 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1814,
- b) p5A3 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1815,
- 25 c) p5F6 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1816,
- d) p2A29 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1817,
- 30 e) pDP428 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1818,
- f) p5B5 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1819,
- g) p1C7 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1820,
- 35 h) p2D7 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1821,

i) p1B7 déposé le 31 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1843,

j) pJVED/*M. tuberculosis* déposé le 25 juillet 1997 à la CNCM sous le N° I-1907,

5 k) pM1C25 déposé le 4 août 1998 à la CNCM sous le n°I-2062.

13. Vecteur recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pDP428 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1818.

10

14. Procédé de criblage de séquences de nucléotides issues de mycobactéries pour déterminer la présence de séquences correspondant à des polypeptides exportés et/ou sécrétés pouvant être induits ou réprimés lors de l'infection, leurs
15 séquences promotrices et/ou régulatrices associées susceptibles notamment de permettre ou de favoriser l'exportation et/ou la sécrétion desdits polypeptides d'intérêt, ou tout ou partie de gènes d'intérêt codant pour lesdits polypeptides, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre
20 un vecteur selon l'une des revendications 1 à 13.

15. Procédé de criblage selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la fragmentation physique des séquences d'ADN de
25 mycobactéries ou leur digestion par au moins une enzyme déterminée et la récupération des fragments obtenus ;

b) l'insertion des fragments obtenus à l'étape a) dans un site de clonage, compatible le cas échéant avec l'enzyme de l'étape a), du polylinker d'un vecteur selon l'une des
30 revendications 1 à 13 ;

c) si besoin, l'amplification desdits fragments contenus dans le vecteur, par exemple par réplication de ce dernier après insertion du vecteur ainsi modifié dans une cellule déterminée, de préférence *E coli* ;

35 d) la transformation de cellules hôtes par le vecteur amplifié à l'étape c), ou en l'absence d'amplification, par le vecteur de l'étape b) ;

- e) la culture de cellules hôtes transformées dans un milieu permettant la mise en évidence du marqueur d'exportation et/ou de sécrétion, et /ou du marqueur d'activité de promoteurs contenu dans le vecteur ;
- 5 f) la détection des cellules hôtes positives (colonies positives) pour l'expression du marqueur d'exportation et/ou de sécrétion, et /ou du marqueur d'activité de promoteurs ;
- 10 g) l'isolement de l'ADN des colonies positives et l'insertion de cet ADN dans une cellule identique à celle de l'étape c) ;
- h) la sélection des insertions contenues dans le vecteur, permettant l'obtention de clones positifs pour le marqueur d'exportation et/ou de sécrétion, et /ou pour le marqueur
- 15 d'activité de promoteurs ;
- i) l'isolement et la caractérisation des fragments d'ADN de mycobactéries contenues dans ces insérats, et l'étape i) du procédé pouvant comporter en outre une étape de séquençage des insertions sélectionnées.
- 20
16. Banque d'ADN génomique ou d'ADNc complémentaire d'ARNm de mycobactérie, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par un procédé selon la revendication 14 et/ou un procédé comprenant les étapes a) et b), ou a), b) et c) du procédé
- 25 selon la revendication 15.
17. Banque d'ADN génomique ou d'ADNc complémentaire d'ARNm de mycobactérie selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite mycobactérie est une mycobactérie pathogène.
- 30
18. Banque d'ADN génomique ou d'ADNc complémentaire d'ARNm de mycobactérie selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite mycobactérie est une mycobactérie appartenant au groupe du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

19. Banque d'ADN génomique ou d'ADNc complémentaire d'ARNm de mycobactérie selon la revendication 18, caractérisée en ce que ladite mycobactérie est *Mycobacterium tuberculosis*.

5 20. Séquence nucléotidique de mycobactérie ou comprenant une séquence nucléotidique de mycobactérie susceptible d'être sélectionnée par un procédé selon l'une des revendications 14 et 15.

10 21. Séquence nucléotidique de mycobactérie ou comprenant une séquence nucléotidique de mycobactérie selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite mycobactérie est choisie parmi *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis*, *M.*
15 *kansassi* ou *M. xénopi*.

22. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 20-21 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences de fragments d'ADN de mycobactérie de séquence
20 nucléique SEQ ID N°1 à SEQ ID N° 24C, SEQ ID N°27A à SEQ ID N°27C, SEQ ID N°29 et SEQ ID N° 31A à SEQ ID N°50F.

23. Séquence nucléotidique de mycobactérie l'une des revendications 20-21 caractérisée en ce qu'elle est choisie
25 parmi les séquences de fragments d'ADN de mycobactérie de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3A, SEQ ID N°5A, SEQ ID N°6A, SEQ ID N°7A, SEQ ID N°8A, SEQ ID N°9A, SEQ ID N°10A, SEQ ID N°27A ou SEQ ID N°29 contenus respectivement dans les vecteurs pDP428 (CNCM, N°I-1818), p6D7 (CNCM, N°I-1814),
30 p5F6 (CNCM, N°I-1816), p2A29 (CNCM, N°I-1817), p5B5 (CNCM, N°I-1819), p1C7 (CNCM, N°I-1820), p2D7 (CNCM, N°I-1821), p1B7 (CNCM, N°I-1843), p5A3 (CNCM, N°I-1815) et pM1C25 (CNCM, N°I-2062).

35 24. Séquence nucléotidique comprenant la totalité du cadre ouvert de lecture d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 20 à 23.

III

25. Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi :

- a) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire de la séquence d'un polynucléotide selon l'une des revendications 20 à 24,
- b) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 50% d'identité avec un polynucléotide selon l'une des revendications 20 à 24,
- 10 c) un polynucléotide hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence de polynucléotide selon l'une des revendications 20 à 24,
- d) un fragment d'au moins 8 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide défini selon l'une des revendications 20 à 24 ou défini en a).

26. Polypeptide, leurs fragments ou fragments biologiquement actifs ou leurs polypeptides homologues, susceptible d'être codé par une séquence nucléotidique de mycobactérie selon l'une des revendications 20 à 25, et susceptible d'être exporté et/ou sécrété, et/ou induit ou réprimé, ou exprimé de façon constitutive lors de l'infection.

25 27. Mycobactérie recombinante caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 13.

28. Polynucléotide dont la séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques de séquence SEQ ID N°1 à SEQ ID N°2.

29. Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi :

- 35 a) un polynucléotide dont la séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°2,

- b) un polynucléotide dont la séquence nucléique est la séquence comprise entre le nucléotide en position nt 964 et le nucléotide en position nt 1234, extrémités incluses, de la séquence SEQ ID N°1,
- 5 c) un polynucléotide dont la séquence est complémentaire de la séquence d'un polynucléotide défini en a) ou b),
- d) un polynucléotide dont la séquence comporte au moins 50% d'identité avec un polynucléotide défini en a), b) ou c),
- e) un polynucléotide hybridant dans des conditions de forte
- 10 stringence avec une séquence de polynucléotide défini en a), b), c) ou d),
- f) un fragment d'au moins 8 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide défini en a), b), c), d) ou e).
- 15 30. Polynucléotide selon l'une des revendications 20 à 25, 28 et 29, caractérisé en ce que sa séquence nucléique hybride avec l'ADN de séquence de mycobactéries et préférentiellement avec de l'ADN de séquences de mycobactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium*
- 20 *tuberculosis*.
31. Polypeptide caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence polynucléotidique selon l'une des revendications 20 à 25.
- 25 32. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :
- a) un polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans une séquence d'acides aminés choisie parmi
- 30 les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 24C, SEQ ID N° 27A à SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 30 à SEQ ID N° 50F,
- b) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a),
- c) un fragment d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide
- 35 défini en a) ou b),
- d) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b), ou c).

33. Polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, ou polypeptide de séquence d'acides aminés SEQ ID N°28.
34. Polynucléotide caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide selon l'un des revendications 32 et 33.
35. Séquence d'acide nucléique utilisable comme amorce, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences d'acide nucléique de polynucléotide selon l'une des revendications 20 à 25, 28 à 30, et 34.
36. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 35, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences SEQ ID N°25 et SEQ ID N°26.
37. Séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 35 et 36 pour la détection et/ou l'amplification de séquences nucléiques.
38. Séquence d'acide nucléique utilisable comme sonde, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences d'acide nucléique selon l'une des revendications 20 à 25, 28 à 30, et 34.
39. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 38, caractérisée en ce qu'elle est marquée par un composé radioactif ou par un composé non radioactif.
40. Séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 38 et 39, caractérisée en ce que celle-ci est immobilisée sur un support, de manière covalente ou non-covalente.

41. Séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 38 à 40 pour la détection et/ou l'amplification de séquences nucléiques.
- 5 42. Séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 38 à 41, caractérisée en ce que ladite séquence est une séquence comprise entre le nucléotide en position nt 964 et le nucléotide en position nt 1234, extrémités incluses, de la séquence SEQ ID N°1.
- 10 43. Vecteur recombinant de clonage, d'expression et/ou d'insertion, caractérisé en ce qu'il contient une séquence d'acide nucléique de polynucléotide selon l'une des revendications 20 à 25, 28 à 30, et 34.
- 15 44. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur recombinant selon la revendication 43.
- 20 45. Cellule hôte selon la revendication 44, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche de *E. coli* transformée par le plasmide pDP428 déposé le 28 janvier 1997 à la CNCM sous le N°I-1818 ou transformée par le plasmide pM1C25 déposé le 4 août 1998 à la CNCM sous le n°I-2062, ou d'une souche de
- 25 *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum* possédant potentiellement tous les systèmes de régulation appropriés.
- 30 46. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur selon la revendication 43.
47. Polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 46.
- 35 48. Polypeptide hybride, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 26, 32, 33 et 47 et une séquence d'un

polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

49. Polypeptide hybride selon la revendication 48, caractérisé en ce que le polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire contient au moins un déterminant antigénique capable d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire.

50. Polynucléotide codant pour un polypeptide hybride selon l'une des revendications 48 et 49.

51. Polypeptide hybride selon l'une des revendications 48 et 49, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine recombinante obtenue par l'expression d'un polynucléotide selon la revendication 50.

52. Procédé pour la détection *in vitro* d'anticorps dirigés contre une mycobactérie et préférentiellement une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un polypeptide selon l'une des revendications 26, 32, 33 et 47 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

53. Procédé pour la détection d'une infection par une mycobactérie et préférentiellement une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un mammifère, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) préparation d'un échantillon biologique contenant des cellules dudit mammifère plus particulièrement des cellules du système immunitaire dudit mammifère et plus particulièrement encore des cellules T ;

b) incubation de l'échantillon biologique de l'étape a) avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 26, 32, 33 et 47 ;

5 c) détection d'une réaction cellulaire indiquant une sensibilisation préalable du mammifère audit polypeptide notamment la prolifération cellulaire et/ou la synthèse de protéines telles que l'interféron gamma;

d) détection d'une réaction d'hypersensibilité retardée ou de sensibilisation du mammifère audit polypeptide.

10

54. Kit pour le diagnostic in vitro d'une infection par une mycobactérie appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*, comprenant :

15 a) un polypeptide selon l'une des revendications 26, 32, 33 et 47 ;

b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique;

c) les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique ;

20 d) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par ledit polypeptide ;

e) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée
25 d'anticorps reconnus par ledit polypeptide.

55. Anticorps mono- ou polyclonaux, leurs fragments, ou anticorps chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon
30 l'une des revendications 26, 32, 33 et 47 .

56. Anticorps selon la revendication 55, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps marqué.

35 57. Procédé pour la détection spécifique de la présence d'un antigène d'une bactérie du complexe *Mycobacterium*

tuberculosis dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 55 et 56 ;
- 5 b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

58. Kit pour la détection spécifique de la présence d'un antigène d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en

10 ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'une des revendications 55 et 56 ;
- b) les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- 15 c) les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

59. Procédé de détection et d'identification rapide d'une mycobactérie et préférentiellement de *M. tuberculosis* dans

20 un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- a) isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ;
- 25 b) amplification spécifique de l'ADN des mycobactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* à l'aide d'amorces selon l'une des revendications 35 à 37 ;
- c) analyse des produits d'amplification.

30 60. Procédé pour la détection de bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'une sonde oligonucléotidique selon
- 35 l'une des revendications 38 à 42 avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique

ayant, le cas échéant, préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ;

- 5 b) détection de l'hybride formé entre la sonde oligonucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

61. Procédé pour la détection de bactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon
10 biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'une sonde oligonucléotidique immobilisée sur un support selon la revendication 40 avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon, ayant,
15 le cas échéant, été préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ;

- b) mise en contact de l'hybride formé entre la sonde
20 oligonucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé avec la sonde, avec une sonde oligonucléotidique marquée selon la revendication 39.

25

62. Procédé de détection selon la revendication 61, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon biologique, ou l'ADNc obtenu par transcription inverse de l'ARN de l'échantillon, est
30 amplifié à l'aide d'un couple d'amorces selon l'une des revendications 35 à 37.

63. Procédé pour la détection de la présence d'une bactérie appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis* dans
35 un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un couple d'amorces selon l'une des revendications 35 à 37, l'ADN contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ;
- b) amplification de l'ADN de la bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ;
- c) mise en évidence de l'amplification de fragments d'ADN correspondant au fragment encadré par les amorces, par exemple par électrophorèse sur gel ou au moyen d'une sonde oligonucléotidique marquée selon la revendication 39.

64. Procédé pour la détection de la présence d'une bactérie appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec deux couples d'amorces selon l'une des revendications 35 à 37, l'ADN contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant une hybridation des amorces à l'ADN d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ;
- b) amplification de l'ADN de la bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* ;
- c) mise en évidence de l'amplification de fragments d'ADN correspondant au fragment encadré par lesdites amorces, par exemple par électrophorèse sur gel ou au moyen d'une sonde oligonucléotidique marquée selon la revendication 39.

65. Kit pour la détection de la présence d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde oligonucléotidique selon l'une des revendications 38 à 42 ;
b) les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation ;
5 c) le cas échéant, un couple d'amorces selon l'une des revendications 35 à 37 ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN (ADN génomique, plasmidique ou ADNc) d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.
- 10 66. Kit ou nécessaire pour la détection de la présence d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :
- 15 a) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de capture, selon la revendication 40 ;
b) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, selon l'une des revendications 38 à 42 ;
c) le cas échéant, un couple d'amorces selon l'une des
20 revendications 35 à 37 ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.
- 25 67. Kit pour l'amplification de l'ADN d'une bactérie du complexe *Mycobacterium tuberculosis* présent dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :
- a) un couple d'amorces selon l'une des revendications 35 à 37 ;
30 b) les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN ;
c) éventuellement un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde oligonucléotidique selon l'une des revendications 38
35 à 42.

68. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides selon l'une des revendications 26, 32, 33 et 47 et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'une des revendications 48, 49 et 51.

69. Vaccin caractérisé en ce qu'il contient un ou plusieurs polypeptides selon l'une des revendications 26, 32, 33 et 47 et/ou un ou plusieurs polypeptides hybrides selon l'une des revendications 48, 49 et 51, en association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible et, le cas échéant un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

70. Vaccin destiné à l'immunisation à l'encontre d'une infection bactérienne ou virale, telle que la tuberculose ou l'hépatite, comprenant un vecteur selon la revendication 43 ou un polynucléotide selon la revendication 50, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

71. Vaccin caractérisé en ce qu'il contient une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 20 à 24 et/ou un ou plusieurs polynucléotides selon la revendication 25 en association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

72. Méthode de criblage de molécules capables d'inhiber la croissance de mycobactéries ou le maintien de mycobactéries dans un hôte, caractérisée en ce que lesdites molécules bloquent la synthèse ou la fonction des polypeptides codés par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 ou par un polynucléotide selon la revendication 25.

73. Méthode de criblage selon la revendication 72, caractérisée en ce que les molécules sont des anti-messagers ou induisent la synthèse d'anti-messagers.

5 74. Molécules capables d'inhiber la croissance de mycobactéries ou le maintien de mycobactéries dans un hôte, caractérisées en ce que lesdites molécules sont synthétisées d'après la structure des polypeptides codés par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des
10 revendications 20 à 24 ou par un polynucléotide selon la revendication 25.

15

20

1/185

1 GGATCCCAGGGAACGTGACC ATG GTC GTA GGG ATG ACT TGA CAGTTTCAACGGGGTCCGACCACCGTTGCGC 72
 1 M V V G M T * 7

73 TCAGAAGGCATACGTTGGTGAACACGTCGGAAGCTGGGAGGTGAATCTG ATG GCT GGC GAC CAA GAG CTG 144
 1 M A G D Q E L 7

145 GAA CTG CGG TTC GAC GTT CCT CTT TAC ACG CTT GCC GAG GCA TCG CGG TAC CTG GTG GTT 204
 8 E L R F D V P L Y T L A E A S R Y L V V 27

205 CCC CGC GCC ACC CTG GCT ACG TGG GCT GAC GGC TAC GAG CGT CGG CCG GCC AAC GCA CCG 264
 28 P R A T L A T W A D G Y E R R P A N A P 47

265 GCG GTC CAG GGG CAA CCG ATC GCC TTT GAC GCC TAT TCG GTC GCG CAG CTT TTT GGC GAC 324
 48 A V Q G Q P I A F D A Y S V A Q L F G D 67

325 GTC ACT GGT GCC CGC GTT GCG GGC GTC CAG CCG CAG CGA CAC CAC ATA CCG CCG GTC CCG 384
 68 V T G A R V A G V Q P Q R H H I R P V R 87

385 TTG CGG GGG CCG TTG GGT GGG GTT GGG TGC CTC CGT CAC CCC AGG CAG TTC GCT GGC TAT 444
 88 L R G P L G G V G C L R H P R Q F A G Y 107

445 TTG TCG CAG TAG CGCGACGGCATTGTGCG ATG TCT TGG TAG CTAGCATCCGGTCGGGGGGCCGCTACCAGCG 515
 108 L S Q * M S W * 4

516 CCAGCGCCGGGGCTCCCCGGTCCGGGTAGTGCCTCGAGTTGGTCTGGACCAGCA ATG ACT GCG ACC CCG 587
 1 M T A T R 5

588 CGA CTT CGA AAC CGC CAC CGG TTA GAT TCC CCG ACT GCG TCA TCG CCA GGT AAA CCG CCG 647
 6 R L R N R H R L D S P T A S S P G K P P 25

648 GCA CTA ACG CCA GCA ACC AAC CCG TGA AGACCAACCAACGGCACCTGGCGAGGTTGCGGCTCAACCGCATC 718
 26 A L T P A T N P * 34

719 ATG AAC TGC TGG ATT TCG GAC TCC CCG TAC TCT CGC GCA GTG CGT GCC CGC GAG CCT ACC 778
 1 M N C W I S D S P Y S R A V R A R E P T 20

779 GAA GAT CGC GTG CAT GCG TTC GGC GTG GAC CGC ACA GCA CCT GGA GTT GGC GGC GCC GAG 838
 21 E D R V H A F G V D R T A P G V G G A E 40

839 GGC CGA GAT GGC AGG ATG ACG GAT CGT CGG GGG CGG GAA CTC CCA GGC CGC CGG ACC GTC 898
 41 G R D G R M T D R R G R E L P G R R T V 60

899 GCA AAC CCG TCG CAA ACC CGT CGC AAA CCG TAA GGAGTCATCC ATG AAG ACA GGC ACC GCG 959
 61 A N P S Q T R R K P * M K T G T A 6

960 ACG ACG CGG CGC AGG CTG TTG GCA GTA CTG ATC GCC CTC GCG TTG CCG GGG GCC GCC GTT 1019
 7 T T R R R L L A V L I A L A L P G A A V 26

1020 GCG CTG CTG GCC GAA CCA TCA GCG ACC GGC GCG TCG GAC CCG TGC GCG GCC AGC GAA GTG 1079
 27 A L L A E P S A T G A S D P C A A S E V 46

1080 GCG AGG ACG GTC GGT TCG GTC GCC AAG TCG ATG GGC GAC TAC CTG GAT TCA CAC CCA GAG 1139
 47 A R T V G S V A K S M G D Y L D S H P E 66

1140 ACC AAC CAG GTG ATG ACC GCG GTC TTG CAG CAG CAG GTA GGG CCG GGG TCG GTC GCA TCG 1199
 67 T N Q V M T A V L Q Q Q V G P G S V A S 86

1200 CTG AAG GCC CAT TTC GAG GCG AAT CCC AAG GTC GCA TCG GAT CC 1243
 87 L K A H F E A N P K V A S D 100

SEQ ID N° 1

FIGURE 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2/185

Insert du clone contenant DP428 et contenu dans seq1

```

1/1
GAT CGC CTT TGA CGC CTA TTC GGT CGC GCA GCT TTT TGG CGA CGT CAC TGG TGC CCG CGT
asp arg leu OPA arg leu phe gly arg ala ala phe trp arg arg his trp cys pro arg
61/21
TGC GGG CGT CCA GCC GCA GCG ACA CCA CAT ACG GCC GGT CCG GTT GCG GGG GCC GTT GGG
cys gly arg pro ala ala ala thr pro his thr ala gly pro val ala gly ala val gly
121/41
TGG GGT TGG GTG CCT CCG TCA CCC CAG GCA GTT CGC TGG CTA TTT GTC GCA GTA GCG CGA
trp gly trp val pro pro ser pro gln ala val arg trp leu phe val ala val ala arg
181/61
CGG CAT TGT CGA TGT CTT GGT AGC TAG CAT CCG GTC GGG GGG CCG CTA CCA GCG CCA GCG
arg his cys arg cys leu gly ser AMB his pro val gly gly pro leu pro ala pro ala
241/81
CCG GGG CTC CCC GGT CCG GGT AGT GCG CGT CGA GTT GGT CGT GGA CCA GCA ATG ACT GCG
pro gly leu pro gly pro gly ser ala arg arg val gly arg gly pro ala met thr ala
301/101
ACC CGG CGA CTT CGA AAC CGC CAC CGG TTA GAT TCC CCG ACT GCG TCA TCG CCA GGT AAA
thr arg arg leu arg asn arg his arg leu asp ser pro thr ala ser ser pro gly lys
361/121
CCG CCG GCA CTA ACG CCA GCA ACC AAC CCG TGA AGA CCA ACC AAC GGC ACC TGC GCA GGT
pro pro ala leu thr pro ala thr asn pro OPA arg pro thr asn gly thr cys ala gly
421/141
TGC GGC TCA ACC GCA TCA TGA ACT GCT GGA TTT CCG ACT CCC CGT ACT CTC GCG CAG TGC
cys gly ser thr ala ser OPA thr ala gly phe arg thr pro arg thr leu ala gln cys
481/161
GTG CCC GCG AGC CTA CCG AAG ATC GCG TGC ATG CGT TCG GCG TGG ACC GCA CAG CAC CTG
val pro ala ser leu pro lys ile ala cys met arg ser ala trp thr ala gln his leu
541/181
GAG TTG GCG GCG CCG AGG GCC GAG ATG GCA GGA TGA CCG ATC GTC GGG GGC GGG AAC TCC
glu leu ala ala pro arg ala glu met ala gly OPA arg ile val gly gly gly asn ser
601/201
CAG GCC GCC GGA CCG TCG CAA ACC CGT CGC AAA CCC GTC GCA AAC CGT AAG GAG TCA TCC
gln ala ala gly pro ser gln thr arg arg lys pro val ala asn arg lys glu ser ser
661/221
ATG AAG ACA GGC ACC GCG ACG ACG CCG CGC AGG CTG TTG GCA GTA CTG ATC GCC CTC GCG
met lys thr gly thr ala thr thr arg arg arg leu leu ala val leu ile ala leu ala
721/241
TTG CCG GGG GCC GCC GTT GCG CTG CTG GCC GAA CCA TCA GCG ACC GGC GCG TCG GAC CCG
leu pro gly ala ala val ala leu leu ala glu pro ser ala thr gly ala ser asp pro
781/261
TGC GCG GCC AGC GAA GTG GCG AGG ACG GTC GGT TCG GTC GCC AAG TCG ATG GGC GAC TAC
cys ala ala ser glu val ala arg thr val gly ser val ala lys ser met gly asp tyr
841/281
CTG GAT TCA CAC CCA GAG ACC AAC CAG GTG ATG ACC GCG GTC TTG CAG CAG CAG GTA GGG
leu asp ser his pro glu thr asn gln val met thr ala val leu gln gln gln val gly
901/301
CCG GGG TCG GTC GCA TCG CTG AAG GCC CAT TTC GAG GCG AAT CCC AAG GTC GCA TCG GAT C
pro gly ser val ala ser leu lys ala his phe glu ala asn pro lys val ala ser asp

```

SEQ ID N° 1A'

FIGURE 1A'

3/185

Insert du clone contenant DP428, autre phase de lecture

2/1 32/11
 ATC GCC TTT GAC GCC TAT TCG GTC GCG CAG CTT TTT GGC GAC GTC ACT GGT GCC CGC GTT
 ile ala phe asp ala tyr ser val ala gln leu phe gly asp val thr gly ala arg val
 62/21 92/31
 GCG GGC GTC CAG CCG CAG CGA CAC CAC ATA CGG CCG GTC CCG TTG CCG GGG CCG TTG GGT
 ala gly val gln pro gln arg his his ile arg pro val arg leu arg gly pro leu gly
 122/41 152/51
 GGG GTT GGG TGC CTC CGT CAC CCC AGG CAG TTC GCT GGC TAT TTG TCG CAG TAG CGC GAC
 gly val gly cys leu arg his pro arg gln phe ala gly tyr leu ser gln AMB arg asp
 182/61 212/71
 GGC ATT GTC GAT GTC TTG GTA GCT AGC ATC CGG TCG GGG GGC CGC TAC CAG CGC CAG CGC
 gly ile val asp val leu val ala ser ile arg ser gly gly arg tyr gln arg gln arg
 242/81 272/91
 CGG GGC TCC CCG GTC CCG GTA GTG CGC GTC GAG TTG GTC GTG GAC CAG CAA TGA CTG CGA
 arg gly ser pro val arg val val arg val glu leu val val asp gln gln OPA leu arg
 302/101 332/111
 CCC GGC GAC TTC GAA ACC GCC ACC GGT TAG ATT CCC CGA CTG CGT CAT CGC CAG GTA AAC
 pro gly asp phe glu thr ala thr gly AMB ile pro arg leu arg his arg gln val asn
 362/121 392/131
 CGC CGG CAC TAA CGC CAG CAA CCA ACC CGT GAA GAC CAA CCA ACG GCA CCT GCG CAG GTT
 arg arg his OCH arg gln gln pro thr arg glu asp gln pro thr ala pro ala gln val
 422/141 452/151
 GCG GCT CAA CCG CAT CAT GAA CTG CTG GAT TTC GGA CTC CCC GTA CTC TCG CGC AGT GCG
 ala ala gln pro his his glu leu leu asp phe gly leu pro val leu ser arg ser ala
 482/161 512/171
 TGC CCG CGA GCC TAC CGA AGA TCG CGT GCA TGC GTT CCG CGT GGA CCG CAC AGC ACC TGG
 cys pro arg ala tyr arg arg ser arg ala cys val arg arg gly pro his ser thr trp
 542/181 572/191
 AGT TGG CCG CGC CGA GGG CCG AGA TGG CAG GAT GAC GGA TCG TCG GGG GCG GGA ACT CCC
 ser trp arg arg arg gly pro arg trp gln asp gly ser ser gly ala gly thr pro
 602/201 632/211
 AGG CCG CCG GAC CGT CGC AAA CCC GTC GCA AAC CCG TCG CAA ACC GTA AGG AGT CAT CCA
 arg pro pro asp arg arg lys pro val ala asn pro ser gln thr val arg ser his pro
 662/221 692/231
 TGA AGA CAG GCA CCG CGA CGA CGC GGC GCA GGC TGT TGG CAG TAC TGA TCG CCC TCG CGT
 OPA arg gln ala pro arg arg arg gly ala gly cys trp gln tyr OPA ser pro ser arg
 722/241 752/251
 TGC CGG GGG CCG CCG TTG CGC TGC TGG CCG AAC CAT CAG CGA CCG GCG CGT CGG ACC CGT
 cys arg gly pro pro leu arg cys trp pro asn his gln arg pro ala arg arg thr arg
 782/261 812/271
 GCG CGG CCA GCG AAG TGG CGA GGA CGG TCG GTT CGG TCG CCA AGT CGA TGG GCG ACT ACC
 ala arg pro ala lys trp arg gly arg ser val arg ser pro ser arg trp ala thr thr
 842/281 872/291
 TGG ATT CAC ACC CAG AGA CCA ACC AGG TGA TGA CCG CGG TCT TGC AGC AGC AGG TAG GGC
 trp ile his thr gln arg pro thr arg OPA OPA pro arg ser cys ser ser arg AMB gly
 902/301 932/311
 CGG GGT CCG TCG CAT CGC TGA AGG CCC ATT TCG AGG CGA ATC CCA AGG TCG CAT CGG ATC
 arg gly arg ser his arg OPA arg pro ile ser arg arg ile pro arg ser his arg ile

SEQ ID N° 1B'

FIGURE 1B'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4/185

Seq1C: Insert du clone DP428, autre phase de lecture

3/1 33/11
 TCG CCT TTG ACG CCT ATT CGG TCG CGC AGC TTT TTG GCG ACG TCA CTG GTG CCC GCG TTG
 ser pro leu thr pro ile arg ser arg ser phe leu ala thr ser leu val pro ala leu
 63/21 93/31
 CGG GCG TCC AGC CGC AGC GAC ACC ACA TAC GGC CGG TCC GGT TGC GGG GGC CGT TGG GTG
 arg ala ser ser arg ser asp thr thr tyr gly arg ser gly cys gly gly arg trp val
 123/41 153/51
 GGG TTG GGT GCC TCC GTC ACC CCA GGC AGT TCG CTG GCT ATT TGT CGC AGT AGC GCG ACG
 gly leu gly ala ser val thr pro gly ser ser leu ala ile cys arg ser ser ala thr
 183/61 213/71
 GCA TTG TCG ATG TCT TGG TAG CTA GCA TCC GGT CGG GGG GCC GCT ACC AGC GCC AGC GCC
 ala leu ser met ser trp AMB leu ala ser gly arg gly ala ala thr ser ala ser ala
 243/81 273/91
 GGG GCT CCC CGG TCC GGG TAG TGC GCG TCG AGT TGG TCG TGG ACC AGC AAT GAC TGC GAC
 gly ala pro arg ser gly AMB cys ala ser ser trp ser trp thr ser asn asp cys asp
 303/101 333/111
 CCG GCG ACT TCG AAA CCG CCA CCG GTT AGA TTC CCC GAC TGC GTC ATC GCC AGG TAA ACC
 pro ala thr ser lys pro pro pro val arg phe pro asp cys val ile ala arg OCH thr
 363/121 393/131
 GCC GGC ACT AAC GCC AGC AAC CAA CCC GTG AAG ACC AAC CAA CGG CAC CTG CGC AGG TTG
 ala gly thr asn ala ser asn gln pro val lys thr asn gln arg his leu arg arg leu
 423/141 453/151
 CGG CTC AAC CGC ATC ATG AAC TGC TGG ATT TCG GAC TCC CCG TAC TCT CGC GCA GTG CGT
 arg leu asn arg ile met asn cys trp ile ser asp ser pro tyr ser arg ala val arg
 483/161 513/171
 GCC CGC GAG CCT ACC GAA GAT CGC GTG CAT GCG TTC GGC GTG GAC CGC ACA GCA CCT GGA
 ala arg glu pro thr glu asp arg val his ala phe gly val asp arg thr ala pro gly
 543/181 573/191
 GTT GGC GGC GCC GAG GGC CGA GAT GGC AGG ATG ACG GAT CGT CGG GGG CGG GAA CTC CCA
 val gly gly ala glu gly arg asp gly arg met thr asp arg arg gly arg glu leu pro
 603/201 633/211
 GGC CGC CGG ACC GTC GCA AAC CCG TCG CAA ACC CGT CGC AAA CCG TAA GGA GTC ATC CAT
 gly arg arg thr val ala asn pro ser gln thr arg arg lys pro OCH gly val ile his
 663/221 693/231
 GAA GAC AGG CAC CGC GAC GAC GCG GCG CAG GCT GTT GGC AGT ACT GAT CGC CCT CGC GTT
 glu asp arg his arg asp asp ala ala gln ala val gly ser thr asp arg pro arg val
 723/241 753/251
 GCC GGG GGC CGC CGT TGC GCT GCT GGC CGA ACC ATC AGC GAC CGG CGC GTC GGA CCC GTG
 ala gly gly arg arg cys ala ala gly arg thr ile ser asp arg arg val gly pro val
 783/261 813/271
 CGC GGC CAG CGA AGT GGC GAG GAC GGT CGG TTC GGT CGC CAA GTC GAT GGG CGA CTA CCT
 arg gly gln arg ser gly glu asp gly arg phe gly arg gln val asp gly arg leu pro
 843/281 873/291
 GGA TTC ACA CCC AGA GAC CAA CCA GGT GAT GAC CGC GGT CTT GCA GCA GCA GGT AGG GCC
 gly phe thr pro arg asp gln pro gly asp asp arg gly leu ala ala ala gly arg ala
 903/301 933/311
 GGG GTC GGT CGC ATC GCT GAA GGC CCA TTT CGA GGC GAA TCC CAA GGT CGC ATC GGA TC
 gly val gly arg ile ala glu gly pro phe arg gly glu ser gln gly arg ile gly

SEQ ID N° 1C'

FIGURE 1C'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/185

Séquence codante DP428 identique à la séquence Rv0203 prédite par Cole et al.
(Nature 393:537-544)

```

1/1                               31/11
ATG AAG ACA GGC ACC GCG ACG ACG CGG CGC AGG CTG TTG GCA GTA CTG ATC GCC CTC GCG
Met lys thr gly thr ala thr thr arg arg arg leu leu ala val leu ile ala leu ala
61/21                               91/31
TTG CCG GGG GCC GCC GTT GCG CTG CTG GCC GAA CCA TCA GCG ACC GGC GCG TCG GAC CCG
leu pro gly ala ala val ala leu leu ala glu pro ser ala thr gly ala ser asp pro
121/41                               151/51
TGC GCG GCC AGC GAA GTG GCG AGG ACG GTC GGT TCG GTC GCC AAG TCG ATG GGC GAC TAC
cys ala ala ser glu val ala arg thr val gly ser val ala lys ser met gly asp tyr
181/61                               211/71
CTG GAT TCA CAC CCA GAG ACC AAC CAG GTG ATG ACC GCG GTC TTG CAG CAG CAG GTA GGG
leu asp ser his pro glu thr asn gln val met thr ala val leu gln gln gln val gly
241/81                               271/91
CCG GGG TCG GTC GCA TCG CTG AAG GCC CAT TTC GAG GCG AAT CCC AAG GTC GCA TCG GAT
pro gly ser val ala ser leu lys ala his phe glu ala asn pro lys val ala ser asp
301/101                               331/111
CTG CAC GCG CTT TCG CAA CCG CTG ACC GAT CTT TCG ACT CGG TGC TCG CTG CCG ATC AGC
leu his ala leu ser gln pro leu thr asp leu ser thr arg cys ser leu pro ile ser
361/121                               391/131
GGC CTG CAG GCG ATC GGT TTG ATG CAG GCG GTG CAG GGC GCC CGC CGG TAG
gly leu gln ala ile gly leu met gln ala val gln gly ala arg arg AMB

```

SEQ ID N° 1D

FIGURE 1D

ORF contenant la séquence DP428 et faisant partie de seq1A'

```

1/1                               31/11
TGA CGG ATC GTC GGG GGC GGG AAC TCC CAG GCC GCC GGA CCG TCG CAA ACC CGT CGC AAA
OPA arg ile val gly gly gly asn ser gln ala ala gly pro ser gln thr arg arg lys
61/21                               91/31
CCC GTC GCA AAC CGT AAG GAG TCA TCC ATG AAG ACA GGC ACC GCG ACG ACG CGG CGC AGG
pro val ala asn arg lys glu ser ser met lys thr gly thr ala thr thr arg arg arg
121/41                               151/51
CTG TTG GCA GTA CTG ATC GCC CTC GCG TTG CCG GGG GCC GCC GTT GCG CTG CTG GCC GAA
leu leu ala val leu ile ala leu ala leu pro gly ala ala val ala leu leu ala glu
181/61                               211/71
CCA TCA GCG ACC GGC GCG TCG GAC CCG TGC GCG GCC AGC GAA GTG GCG AGG ACG GTC GGT
pro ser ala thr gly ala ser asp pro cys ala ala ser glu val ala arg thr val gly
241/81                               271/91
TCG GTC GCC AAG TCG ATG GGC GAC TAC CTG GAT TCA CAC CCA GAG ACC AAC CAG GTG ATG
ser val ala lys ser met gly asp tyr leu asp ser his pro glu thr asn gln val met
301/101                               331/111
ACC GCG GTC TTG CAG CAG CAG GTA GGG CCG GGG TCG GTC GCA TCG CTG AAG GCC CAT TTC
thr ala val leu gln gln gln val gly pro gly ser val ala ser leu lys ala his phe
361/121                               391/131
GAG GCG AAT CCC AAG GTC GCA TCG GAT CTG CAC GCG CTT TCG CAA CCG CTG ACC GAT CTT
glu ala asn pro lys val ala ser asp leu his ala leu ser gln pro leu thr asp leu
421/141                               451/151
TCG ACT CGG TGC TCG CTG CCG ATC AGC GGC CTG CAG GCG ATC GGT TTG ATG CAG GCG GTG
ser thr arg cys ser leu pro ile ser gly leu gln ala ile gly leu met gln ala val
481/161
CAG GGC GCC CGC CGG TAG
gln gly ala arg arg AMB

```

SEQ ID N° 1F

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6/185

491 CCGGTCGGGGGGCCGCTACCAGCGCCAGCGCGGGGCTCCCCGGTCCGGGTA GTG CGC GTC GAG TTG GTC GTG 563
 1 V R V E L V V 7
 564 GAC CAG CAA TGA CTGCGACCCGGG GACTTCGAAACCGCCACCGGTTAGATTCCCGACTGCGTCATCCG CAGGTAA 639
 8 D Q Q *
 640 ACCGCCGGCACTAACGCCAGCAACCAACCC GTG AAG ACC AAC CAA CGG CAC CTG CGC AGG TTG CGG 705
 1 V K T N Q R H L R R L R 12
 706 CTC AAC CGC ATC ATG AAC TGC TGG ATT TCG GAC TCC CCG TAC TCT CGC GCA GTG CGT GCC 765
 13 L N R I M N C W I S D S P Y S R A V R A 32
 766 CGC GAG CCT ACC GAA GAT CGC GTG CAT GCG TTC GGC GTG GAC CGC ACA GCA CCT GGA GTT 825
 33 R E P T E D R V H A F G V D R T A P G V 52
 826 GGC GGC GCC GAG GGC CGA GAT GGC AGG ATG ACG GAT CGT CGG GGG CGG GAA CTC CCA GGC 885
 53 G G A E G R D G R M T D R R G R E L P G 72
 886 CGC CGG ACC GTC GCA AAC CCG TCG CAA ACC CGT CGC AAA CCG TAA GGAGTCATCC ATG AAG 946
 73 R R T V A N P S Q T R R K P * xxxxxx M K 2
 947 ACA GGC ACC GCG ACG ACG CGG CGC AGG CTG TTG GCA GTA CTG ATC GCC CTC GCG TTG CCG 1006
 3 T G T A T T R R R L L A V L I A L A L P 22
 1007 GGG GCC GCC GTT GCG CTG CTG GCC GAA CCA TCA GCG ACC GGC GCG TCG GAC CCG TGC GCG 1066
 23 G A A V A L L A E P S A T G A S D P C A 42
 1067 GCC AGC GAA GTG GCG AGG ACG GTC GGT TCG GTC GCC AAG TCG ATG GGC GAC TAC CTG GAT 1126
 43 A S E V A R T V G S V A K S M G D Y L D 62
 1127 TCA CAC CCA GAG ACC AAC CAG GTG ATG ACC GCG GTC TTG CAG CAG CAG GTA GGG CCG GGG 1186
 63 S H P E T N Q V M T A V L Q Q Q V G P G 82
 1187 TCG GTC GCA TCG CTG AAG GCC CAT TTC GAG GCG AAT CCC AAG GTC GCA TCG GAT CTG CAC 1246
 83 S V A S L K A H F E A N P K V A S D L H 102
 1247 GCG CTT TCG CAA CCG CTG ACC GAT CTT TCG ACT CGG TGC TCG CTG CCG ATC AGC GGC CTG 1306
 103 A L S Q P L T D L S T R C S L P I S G L 122
 1307 CAG GCG ATC GGT TTG ATG CAG GCG GTG CAG GGC GCC CGC CGG TAG ATG CCG GAC CGC CGC 1366
 123 Q A I G L M Q A V Q G A R R * M P D R R 5
 1367 CGG GTC CGG CGC AGT CGA CGT GAG GCA GCG GTC GCC TAC CGG GGC GGT GTC TCG CCG CCT 1426
 6 R V R R S R R E A A V A Y R G G V S P P 25
 1427 TCT GGT CGC AGG TCA GGG GTC GGC GCT GGA CCT TGC GGT GTG GTT TCG ACC GGG TCG TCG 1486
 26 S G R R S G V G A G P C G V V S T G S S 45
 1487 CAG GGT GTG CCC TGC GGT TGG ATG ACA AGT CGC AGG TTT GGA TCG GTT GGC GGG TCG CGA 1546
 46 Q G V P C G W M T S R R F G S V G G S R 65
 1547 TCG TTG T 1553
 65 S L 67

SEQ ID N° 2

FIGURE 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

7/185

31/11
 TCG CCG GCT CGC GGA CGT AGA TAA TAG CTC ACC GTT GGA CGA CCT CGA CAG GGT CCT TTG
 ser pro ala arg gly arg arg OCH AMB leu thr val gly arg pro arg gln gly pro leu
 61/21
 91/31
 TGA CTG CCG GGC TTG ACG CGG ACG ACC ACA GAG TCG GGT CAT CGC CTA AGG CTA CCG TTC
 OPA leu pro gly leu thr arg thr thr thr glu ser gly his arg leu arg leu pro phe
 121/41
 151/51
 TGA CCT GGG GTG CGT GGG CGC CGA CGA GTG AGG CAG TCA TGT CTC AGG GCC CAC CGC CAC
 OPA pro gly val arg gly arg arg arg val arg gln ser cys leu arg ala his arg his
 181/61
 211/71
 CTC GGT CGC CGG CAG TGT CAG CAT GTG CAG ATG ACT CCA CGC AGC TTG TTC GTG TTG GTG
 leu gly arg arg qln cys gln his val gln met thr pro arg ser leu phe val leu val
 241/81
 271/91
 TCG TGG TTG CGA CGA CTT GGC GCT GGT GAG CGC ACC CGC CGG CGT CGT GCC GCG CAT GCG
 ser trp leu arg arg leu gly ala gly glu arg thr arg arg arg arg ala ala his ala
 301/101
 GAT C
 asp

SEQ ID N° 3A

FIGURE 3A

32/11
 CGC CGG CTC GCG GAC GTA GAT AAT AGC TCA CCG TTG GAC GAC CTC GAC AGG GTC CTT TGT
 arg arg leu ala asp val asp asn ser ser pro leu asp asp leu asp arg val leu cys
 62/21
 92/31
 GAC TGC CGG GCT TGA CGC GGA CGA CCA CAG AGT CGG GTC ATC GCC TAA GGC TAC CGT TCT
 asp cys arg ala OPA arg gly arg pro gln ser arg val ile ala OCH gly tyr arg ser
 122/41
 152/51
 GAC CTG GGG TGC GTG GGC GCC GAC GAG TGA GGC AGT CAT GTC TCA GGG CCC ACC GCC ACC
 asp leu gly cys val gly ala asp glu OPA gly ser his val ser gly pro thr ala thr
 182/61
 212/71
 TCG GTC GCC GGC AGT GTC AGC ATG TGC AGA TGA CTC CAC GCA GCT TGT TCG TGT TGG TGT
 ser val ala gly ser val ser met cys arg OPA leu his ala ala cys ser cys trp cys
 242/81
 272/91
 CGT GGT TGC GAC GAC TTG GCG CTG GTG AGC GCA CCC GCC GGC GTC GTG CCG CGC ATG CGG
 arg gly cys asp asp leu ala leu val ser ala pro ala gly val val pro arg met arg
 302/101
 ATC
 ile

SEQ ID N° 3B

FIGURE 3B

8/185

33/11
 GCC GGC TCG CGG ACG TAG ATA ATA GCT CAC CGT TGG ACG ACC TCG ACA GGG TCC TTT GTG
 ala gly ser arg thr AMB ile ile ala his arg trp thr thr ser thr gly ser phe val
 63/21 93/31
 ACT GCC GGG CTT GAC GCG GAC GAC CAC AGA GTC GGG TCA TCG CCT AAG GCT ACC GTT CTG
 thr ala gly leu asp ala asp asp his arg val gly ser ser pro lys ala thr val leu
 123/41 153/51
 ACC TGG GGT GCG TGG GCG CCG ACG AGT GAG GCA GTC ATG TCT CAG GGC CCA CCG CCA CCT
 thr trp gly ala trp ala pro thr ser glu ala val met ser gln gly pro pro pro pro
 183/61 213/71
 CGG TCG CCG GCA GTG TCA GCA TGT GCA GAT GAC TCC ACG CAG CTT GTT CGT GTT GGT GTC
 arg ser pro ala val ser ala cys ala asp ser thr gln leu val arg val gly val
 243/81 273/91
 GTG GTT GCG ACG ACT TGG CGC TGG TGA GCG CAC CCG CCG GCG TCG TGC CGC GCA TGC GGA
 val val ala thr thr trp arg trp OPA ala his pro pro ala ser cys arg ala cys gly

TC

SEQ ID N° 3C

FIGURE 3C

31/11
 CCA ATT TTC CTT CGC GCC GTG CAA TAC CAT CTG CAA GAC CAG CGA CGG CCC GTG GTT GCG
 pro ile phe leu arg ala val gln tyr his leu gln asp gln arg arg pro val val ala
 61/21 91/31
 GTC GCG CAG CTT GCG GAA ACC GGG TAT GGA CCC TGC CGT ACC GTT GTT GCC ACT TGA TGT
 val ala gln leu ala glu thr gly tyr gly pro cys arg thr val val ala thr OPA cys
 121/41 151/51
 CGT CGC TCT CCA CCC GTC GGG GGG CGA AAG CCA TTC CGA CAC TGG GAT CCT CAA AAC GTC
 arg arg ser pro pro val gly gly arg lys pro phe arg his trp asp pro gln asn val
 181/61 211/71
 GGC TGA GTG TCT GCA GGG CTC CGG GGA GCA GCC GAT CAT CAC CAT GTA CGA ACT GAA TAA
 gly OPA val ser ala gly leu arg gly ala ala asp his his his val arg thr glu OCH
 241/81 271/91
 GTC CCC CGC GCG CGA CTT CCA GAC ATT TGT TGT GGT TTC GGT TGA GGC CGA GGC GAG GCT
 val pro arg ala arg leu pro asp ile cys cys gly phe gly OPA gly arg gly glu ala
 301/101 331/111
 CAT TTC GCA GCA ACC GGT CTC CGG GTC GCA GCA TCG TTG CGG CGA TCG CGG CGC AGT CGT
 his phe ala ala thr gly leu arg val ala ala ser leu arg arg ser arg arg ser arg
 361/121
 CGG ACG AGT CGT CGT CAA CGA CCA CGA TC
 arg thr ser arg arg gln arg pro arg

SEQ ID N° 4A

FIGURE 4A

9/185

32/11
 CAA TTT TCC TTC GCG CCG TGC AAT ACC ATC TGC AAG ACC AGC GAC GGC CCG TGG TTG CGG
 gln phe ser phe ala pro cys asn thr ile cys lys thr ser asp gly pro trp leu arg
 62/21
 TCG CGC AGC TTG CGG AAA CCG GGT ATG GAC CCT GCC GTA CCG TTG TTG CCA CTT GAT GTC
 ser arg ser leu arg lys pro gly met asp pro ala val pro leu leu pro leu asp val
 122/41
 GTC GCT CTC CAC CCG TCG GGG GGC GAA AGC CAT TCC GAC ACT GGG ATC CTC AAA ACG TCG
 val ala leu his pro ser gly gly glu ser his ser asp thr gly ile leu lys thr ser
 182/61
 GCT GAG TGT CTG CAG GGC TCC GGG GAG CAG CCG ATC ATC ACC ATG TAC GAA CTG AAT AAG
 ala glu cys leu gln gly ser gly glu gln pro ile ile thr met tyr glu leu asn lys
 242/81
 TCC CCC GCG CGC GAC TTC CAG ACA TTT GTT GTG GTT TCG GTT GAG GCC GAG GCG AGG CTC
 ser pro ala arg asp phe gln thr phe val val val ser val glu ala glu ala arg leu
 302/101
 ATT TCG CAG CAA CCG GTC TCC GGG TCG CAG CAT CGT TGC GGC GAT CGC GGC GCA GTC GTC
 ile ser gln gln pro val ser gly ser gln his arg cys gly asp arg gly ala val val
 362/121
 GGA CGA GTC GTC GTC AAC GAC CAC GAT C
 gly arg val val val asn asp his asp

SEQ ID N° 4B

FIGURE 4B

33/11
 AAT TTT CCT TCG CGC CGT GCA ATA CCA TCT GCA AGA CCA GCG ACG GCC CGT GGT TGC GGT
 asn phe pro ser arg arg ala ile pro ser ala arg pro ala thr ala arg gly cys gly
 63/21
 CGC GCA GCT TGC GGA AAC CGG GTA TGG ACC CTG CCG TAC CGT TGT TGC CAC TTG ATG TCG
 arg ala ala cys gly asn arg val trp thr leu pro tyr arg cys cys his leu met ser
 123/41
 TCG CTC TCC ACC CGT CGG GGG GCG AAA GCC ATT CCG ACA CTG GGA TCC TCA AAA CGT CGG
 ser leu ser thr arg arg gly ala lys ala ile pro thr leu gly ser ser lys arg arg
 183/61
 CTG AGT GTC TGC AGG GCT CCG GGG AGC AGC CGA TCA TCA CCA TGT ACG AAC TGA ATA AGT
 leu ser val cys arg ala pro gly ser ser arg ser ser pro cys thr asn OPA ile ser
 243/81
 CCC CCG CGC GCG ACT TCC AGA CAT TTG TTG TGG TTT CGG TTG AGG CCG AGG CGA GGC TCA
 pro pro arg ala thr ser arg his leu leu trp phe arg leu arg pro arg arg gly ser
 303/101
 TTT CGC AGC AAC CGG TCT CCG GGT CGC AGC ATC GTT GCG GCG ATC GCG GCG CAG TCG TCG
 phe arg ser asn arg ser pro gly arg ser ile val ala ala ile ala ala gln ser ser
 363/121
 GAC GAG TCG TCG TCA ACG ACC ACG ATC
 asp glu ser ser ser thr thr thr ile

SEQ ID N° 4C

FIGURE 4C
 FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

10/185

partie de la séquence nucléotidique de seq4A

```

1/1                               31/11
CCG CGC GCG ACT TCC AGA CAT TTG TTG TGG TTT CGG TTG AGG CCG AGG CGA GGC TCA TTT
pro arg ala thr ser arg his leu leu trp phe arg leu arg pro arg arg gly ser phe
61/21                               91/31
CGC AGC AAG CGG TCT CCG GGT CGC AGC ATC GTT GCG GCG ATC GCG GCG CAG TCG TCG GAC
arg ser lys arg ser pro gly arg ser ile val ala ala ile ala ala gln ser ser asp
121/41
GAG TCG TCG TCA ACG ACC ACG ATC
glu ser ser ser thr thr thr ile

```

SEQ ID N° 4A'

FIGURE 4A'

```

1/1                               31/11
CGC GCG CGA CTT CCA GAC ATT TGT TGT GGT TTC GGT TGA GGC CGA GGC GAG GCT CAT TTC
arg ala arg leu pro asp ile cys cys gly phe gly OPA gly arg gly glu ala his phe
61/21                               91/31
GCA GCA AGC GGT CTC CGG GTC GCA GCA TCG TTG CGG CGA TCG CGG CGC AGT CGT CGG ACG
ala ala ser gly leu arg val ala ala ser leu arg arg ser arg arg ser arg thr
121/41
AGT CGT CGT CAA CGA CCA CGA TC
ser arg arg gln arg pro arg

```

SEQ ID N° 4B'

FIGURE 4B'

```

1/1                               31/11
GCC GCG CGC GAC TTC CAG ACA TTT GTT GTG GTT TCG GTT GAG GCC GAG GCG AGG CTC ATT
ala ala arg asp phe gln thr phe val val val ser val glu ala glu ala arg leu ile
61/21                               91/31
TCG CAG CAA GCG GTC TCC GGG TCG CAG CAT CGT TGC GGC GAT CGC GGC GCA GTC GTC GGA
ser gln gln ala val ser gly ser gln his arg cys gly asp arg gly ala val val gly
121/41
CGA GTC GTC GTC AAC GAC CAC GAT C
arg val val val asn asp his asp

```

SEQ ID N° 4C'

FIGURE 4C'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/185

ORF d'après par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant la séquence Seq 4A'

1/1 31/11
 tga ata agt ccg ccg cgc gcg act tcc aga cat ttg ttg tgg ttt cgg ttg agg ccg agg
 OPA ile ser pro pro arg ala thr ser arg his leu leu trp phe arg leu arg pro arg
 61/21 91/31
 cga ggc tca ttt cgc agc aag cgg tct ccg ggt cgc agc atc gtt gcg gcg atc gcg gcg
 arg gly ser phe arg ser lys arg ser pro gly arg ser ile val ala ala ile ala ala
 121/41 151/51
 cag tcg tcg gac gag tcg tcg tca acg acc acg atc tcg aac tcg acg ccc tcc tgt tcg
 gln ser ser asp glu ser ser ser thr thr thr ile ser asn ser thr pro ser cys ser
 181/61 211/71
 agg atg cta cgc aga cag cgc tcg atg gtg gcg ccg ttg ttg tac atc ggg atg cac acc
 arg met leu arg arg gln arg ser met val ala pro leu leu tyr ile gly met his thr
 241/81 271/91
 gag ata agc ggt ttc gcc ggg ttc acc gat acc acg ctt gat gca tca cca ggc acc aca
 glu ile ser gly phe ala gly phe thr asp thr thr leu asp ala ser pro gly thr thr
 301/101
 tgg cga ctc aga gac tag
 trp arg leu arg asp AMB

SEQ ID N° 4F

FIGURE 4F

séquence en amont de seq4A' et en fusion avec seq4A'

1/1 31/11
 GCA ACC TAC CAG CAG AGC CAG GGG CTC ACA GGA CCT AAA GGA GTA GCG CCC ATG GCT GAT
 ala thr tyr gln gln ser gln gly leu thr gly pro lys gly val ala pro met ala asp

C

SEQ ID N° 4J

FIGURE 4J

seq4J' dans une autre phase de lecture

1/1 31/11
 ACG CAA CCT ACC AGC AGA GCC AGG GGC TCA CAG GAC CTA AAG GAG TAG CGC CCA TGG CTG
 thr gln pro thr ser arg ala arg gly ser gln asp leu lys glu AMB arg pro trp leu
 61/21
 ATC
 ile

SEQ ID N° 4K

FIGURE 4K

seq 4J' dans la troisième phase de lecture

1/1 31/11
 CGC AAC CTA CCA GCA GAG CCA GGG GCT CAC AGG ACC TAA AGG AGT AGC GCC CAT GGC TGA
 arg asn leu pro ala glu pro gly ala his arg thr OCH arg ser ser ala his gly OPA

TC

SEQ ID N° 4L

FIGURE 4L

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

12/185

séquence Rv2050 prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq4J
1/1 31/11
ATG GCT GAT CGT GTC CTG AGG GGC AGT CGC CTC GGA GCC GTG AGC TAT GAG ACC GAC CGC
Met ala asp arg val leu arg gly ser arg leu gly ala val ser tyr glu thr asp arg
61/21 91/31
AAC CAC GAC CTG GCG CCG CGC CAG ATC GCG CGG TAC CGC ACC GAC AAC GGC GAG GAG TTC
asn his asp leu ala pro arg gln ile ala arg tyr arg thr asp asn gly glu glu phe
121/41 151/51
GAA GTC CCG TTC GCC GAT GAC GCC GAG ATC CCC GGC ACC TGG TTG TGC CGC AAC GGC ATG
glu val pro phe ala asp asp ala glu ile pro gly thr trp leu cys arg asn gly met
181/61 211/71
GAA GGC ACC CTG ATC GAG GGC GAC CTG CCC GAG CCG AAG AAG GTT AAG CCG CCC CGG ACG
glu gly thr leu ile glu gly asp leu pro glu pro lys lys val lys pro pro arg thr
241/81 271/91
CAC TGG GAC ATG CTG CTG GAG CGC CGT TCC ATC GAA GAA CTC GAA GAG TTA CTT AAG GAG
his trp asp met leu leu glu arg arg ser ile glu glu leu glu glu leu leu lys glu
301/101 331/111
CGC CTC GAG CTC ATT CGG TCA CGT CGG CGC GGC TGA
arg leu glu leu ile arg ser arg arg arg gly OPA

SEQ ID N° 4M

FIGURE 4M

ORF d'après par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant la séquence Rv2050
1/1 31/11
TAG TCC GCC CGG GTG TCC GAT CCC GGT ATC ATT GAT GGT CGC GCC GCG CGC GTC GCG TGC
AMB ser ala arg val ser asp pro gly ile ile asp gly arg ala ala arg val ala cys
61/21 91/31
CGG GAA CTA CGC AGA CGG CCG CAG CGT TTG CCA ACC GGA GCC AGT CGC CAG TAC GCA ACC
arg glu leu arg arg arg pro gln arg leu pro thr gly ala ser arg gln tyr ala thr
121/41 151/51
TAC CAG CAG AGC CCA GGG CTC ACA GGA CCT AAA GGA GTA GCG CCC ATG GCT GAT CGT GTC
tyr gln gln ser pro gly leu thr gly pro lys gly val ala pro met ala asp arg val
181/61 211/71
CTG AGG GGC AGT CGC CTC GGA GCC GTG AGC TAT GAG ACC GAC CGC AAC CAC GAC CTG GCG
leu arg gly ser arg leu gly ala val ser tyr glu thr asp arg asn his asp leu ala
241/81 271/91
CCG CGC CAG ATC GCG CGG TAC CGC ACC GAC AAC GGC GAG GAG TTC GAA GTC CCG TTC GCC
pro arg gln ile ala arg tyr arg thr asp asn gly glu glu phe glu val pro phe ala
301/101 331/111
GAT GAC GCC GAG ATC CCC GGC ACC TGG TTG TGC CGC AAC GGC ATG GAA GGC ACC CTG ATC
asp asp ala glu ile pro gly thr trp leu cys arg asn gly met glu gly thr leu ile
361/121 391/131
GAG GGC GAC CTG CCC GAG CCG AAG AAG GTT AAG CCG CCC CGG ACG CAC TGG GAC ATG CTG
glu gly asp leu pro glu pro lys lys val lys pro pro arg thr his trp asp met leu
421/141 451/151
CTG GAG CGC CGT TCC ATC GAA GAA CTC GAA GAG TTA CTT AAG GAG CGC CTC GAG CTC ATT
leu glu arg arg ser ile glu glu leu glu glu leu leu lys glu arg leu glu leu ile
481/161
CGG TCA CGT CGG CGC GGC TGA
arg ser arg arg arg gly OPA

SEQ ID N° 4N

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

13/185

31/11
 GAT CGC GGT CAA CGA GGC CGA ATA CGG CGA GAT GTG GGC CCA AGA CGC CGC CGC GAT GTT
 asp arg gly gln arg gly arg ile arg arg asp val gly pro arg arg arg asp val
 61/21
 TGG CTA CGC CGC GGC GAC GGC GAC GGC GAC GGC GAC GTT GCT GCC GTT CGA GGA GGC GCC
 trp leu arg arg gly asp gly asp gly asp gly asp val ala ala val arg gly gly ala
 121/41
 GGA GAT GAC CAG CGC GGG TGG GCT CCT CGA GCA GGC CGC CGC GGT CGA GGA GGC CTC CGA
 gly asp asp gln arg gly trp ala pro arg ala gly arg arg gly arg gly gly leu arg
 181/61
 CAC CGC CGC GGC GAA CCA GTT GAT GAA CAA TGT GCC CCA GGC GCT GCA ACA GCT GGC CCA
 his arg arg gly glu pro val asp glu gln cys ala pro gly ala ala thr ala gly pro
 241/81
 GCC CAC GCA GGG CAC CAC GCC TTC TTC CAA GCT GGG TGG CCT GTG GAA GAC GGT CTC GCC
 ala his ala gly his his ala phe phe gln ala gly trp pro val glu asp gly leu ala
 301/101
 GCA TCG GTC GCC GAT C
 ala ser val ala asp

SEQ ID N° 5A

FIGURE 5A

32/11
 ATC GCG GTC AAC GAG GCC GAA TAC GGC GAG ATG TGG GCC CAA GAC GCC GCC GCG ATG TTT
 ile ala val asn glu ala glu tyr gly glu met trp ala gln asp ala ala ala met phe
 62/21
 GGC TAC GCC GCG GCG ACG GCG ACG GCG ACG GCG ACG TTG CTG CCG TTC GAG GAG GCG CCG
 gly tyr ala ala ala thr ala thr ala thr ala thr leu leu pro phe glu glu ala pro
 122/41
 GAG ATG ACC AGC GCG GGT GGG CTC CTC GAG CAG GCC GCC GCG GTC GAG GAG GCC TCC GAC
 glu met thr ser ala gly gly leu leu glu gln ala ala ala val glu glu ala ser asp
 182/61
 ACC GCC GCG GCG AAC CAG TTG ATG AAC AAT GTG CCC CAG GCG CTG CAA CAG CTG GCC CAG
 thr ala ala ala asn gln leu met asn asn val pro gln ala leu gln gln leu ala gln
 242/81
 CCC ACG CAG GGC ACC ACG CCT TCT TCC AAG CTG GGT GGC CTG TGG AAG ACG GTC TCG CCG
 pro thr gln gly thr thr pro ser ser lys leu gly gly leu trp lys thr val ser pro
 302/101
 CAT CGG TCG CCG ATC
 his arg ser pro ile

SEQ ID N° 5B

FIGURE 5B

14/185

33/11

TCG CGG TCA ACG AGG CCG AAT ACG GCG AGA TGT GGG CCC AAG ACG CCG CCG CGA TGT TTG
 ser arg ser thr arg pro asn thr ala arg cys gly pro lys thr pro pro arg cys leu
 63/21
 GCT ACG CCG CGG CGA CGG CGA CGG CGA CGG CGA CGT TGC TGC CGT TCG AGG AGG CGC CGG
 ala thr pro arg arg arg arg arg arg arg arg arg cys cys arg ser arg arg arg arg
 123/41
 AGA TGA CCA GCG CGG GTG GGC TCC TCG AGC AGG CCG CCG CGG TCG AGG AGG CCT CCG ACA
 arg OPA pro ala arg val gly ser ser ser arg pro pro arg ser arg arg pro pro thr
 183/61
 CCG CCG CGG CGA ACC AGT TGA TGA ACA ATG TGC CCC AGG CGC TGC AAC AGC TGG CCC AGC
 pro pro arg arg thr ser OPA OPA thr met cys pro arg arg cys asn ser trp pro ser
 243/81
 CCA CGC AGG GCA CCA CGC CTT CTT CCA AGC TGG GTG GCC TGT GGA AGA CGG TCT CGC CGC
 pro arg arg ala pro arg leu leu pro ser trp val ala cys gly arg arg ser arg arg
 303/101
 ATC GGT CGC CGA TC
 ile gly arg arg

SEQ ID N° 5C

FIGURE 5C

partie de la séquence nucléotidique Seq 5A

1/1
 CGC CGC GGC GAC GGC GAC GGC GAC GGC GAC GTT GCT GCC GTT CGA GGA GGC GCC GGA GAT
 arg arg gly asp gly asp gly asp gly asp val ala ala val arg gly gly ala gly asp
 61/21
 GAC CAG CGC GGG TGG GCT CCT CGA GCA GGC CGC CGC GGT CGA GGA GGC CTC CGA CAC CGC
 asp gln arg gly trp ala pro arg ala gly arg arg gly arg gly gly leu arg his arg
 121/41
 CGC GGC GAA CCA GTT GAT GAA CAA TGT GCC CCA GGC GCT GCA ACA GCT GGC CCA GCC CAC
 arg gly glu pro val asp glu gln cys ala pro gly ala ala thr ala gly pro ala his
 181/61
 GCA GGG CAC CAC GCC TTC TTC CAA GCT GGG TGG CCT GTG GAA GAC GGT CTC GCC GCA TCG
 ala gly his his ala phe phe gln ala gly trp pro val glu asp gly leu ala ala ser
 241/81
 GTC GCC GAT C
 val ala asp

SEQ ID N° 5A'

FIGURE 5A'

15/185

1/1 31/11
TAC GCC GCG GCG ACG GCG ACG GCG ACG GCG ACG TTG CTG CCG TTC GAG GAG GCG CCG GAG
tyr ala ala ala thr ala thr ala thr ala thr leu leu pro phe glu glu ala pro glu
61/21 91/31
ATG ACC AGC GCG GGT GGG CTC CTC GAG CAG GCC GCC GCG GTC GAG GAG GCC TCC GAC ACC
met thr ser ala gly gly leu leu glu gln ala ala ala val glu glu ala ser asp thr
121/41 151/51
GCC GCG GCG AAC CAG TTG ATG AAC AAT GTG CCC CAG GCG CTG CAA CAG CTG GCC CAG CCC
ala ala ala asn gln leu met asn asn val pro gln ala leu gln gln leu ala gln pro
181/61 211/71
ACG CAG GGC ACC ACG CCT TCT TCC AAG CTG GGT GGC CTG TGG AAG ACG GTC TCG CCG CAT
thr gln gly thr thr pro ser ser lys leu gly gly leu trp lys thr val ser pro his
241/81
CGG TCG CCG ATC
arg ser pro ile

SEQ ID N° 5B'

FIGURE 5B'

1/1 31/11
ACG CCG CGG CGA CGG CGA CGG CGA CGG CGA CGT TGC TGC CGT TCG AGG AGG CGC CGG AGA
thr pro arg arg arg arg arg arg arg arg arg arg cys cys arg ser arg arg arg arg arg
61/21 91/31
TGA CCA GCG CGG GTG GGC TCC TCG AGC AGG CCG CCG CGG TCG AGG AGG CCT CCG ACA CCG
OPA pro ala arg val gly ser ser ser arg pro pro arg ser arg arg pro pro thr pro
121/41 151/51
CCG CGG CGA ACC AGT TGA TGA ACA ATG TGC CCC AGG CGC TGC AAC AGC TGG CCC AGC CCA
pro arg arg thr ser OPA OPA thr met cys pro arg arg cys asn ser trp pro ser pro
181/61 211/71
CGC AGG GCA CCA CGC CTT CTT CCA AGC TGG GTG GCC TGT GGA AGA CGG TCT CGC CGC ATC
arg arg ala pro arg leu leu pro ser trp val ala cys gly arg arg ser arg arg ile
241/81
GGT CGC CGA TC
gly arg arg

SEQ ID N° 5C'

FIGURE 5C'

16/185

ORF prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq5A'

```

1/1                               31/11
tga act gat gat tct gat agc gac caa cct ctt ggg gca aaa cac ccc ggc gat cgc ggt
OPA thr asp asp ser asp ser asp gln pro leu gly ala lys his pro gly asp arg gly
61/21                               91/31
caa cga ggc cga ata cgg cga gat gtg ggc cca aga cgc cgc cgc gat gtt tgg cta cgc
gln arg gly arg ile arg arg asp val gly pro arg arg arg arg asp val trp leu arg
121/41                               151/51
cgc ggc gac ggc gac ggc gac ggc gac gtt gct gcc gtt cga gga ggc gcc gga gat gac
arg gly asp gly asp gly asp gly asp val ala ala val arg gly gly ala gly asp asp
181/61                               211/71
cag cgc ggg tgg gct cct cga gca ggc cgc cgc ggt cga gga ggc ctc cga cac cgc cgc
gln arg gly trp ala pro arg ala gly arg arg gly arg gly gly leu arg his arg arg
241/81                               271/91
ggc gaa cca gtt gat gaa caa tgt gcc cca ggc gct gca aca gct ggc cca gcc cac gca
gly glu pro val asp glu gln cys ala pro gly ala ala thr ala gly pro ala his ala
301/101                               331/111
ggg cac cac gcc ttc ttc caa gct ggg tgg cct gtg gaa gac ggt ctc gcc gca tcg gtc
gly his his ala phe phe gln ala gly trp pro val glu asp gly leu ala ala ser val
361/121                               391/131
gcc gat cag caa cat ggt gtc gat ggc caa caa cca cat gtc gat gac caa ctc ggg tgt
ala asp gln gln his gly val asp gly gln gln pro his val asp asp gln leu gly cys
421/141                               451/151
gtc gat gac caa cac ctt gag ctc gat gtt gaa ggg ctt tgc tcc ggc ggc ggc cgc cca
val asp asp gln his leu glu leu asp val glu gly leu cys ser gly gly gly arg pro
481/161                               511/171
ggc cgt gca aac cgc ggc gca aaa cgg ggt ccg ggc gat gag ctc gct ggg cag ctc gct
gly arg ala asn arg gly ala lys arg gly pro gly asp glu leu ala gly gln leu ala
541/181                               571/191
ggg ttc ttc ggg tct ggg cgg tgg ggt ggc cgc caa ctt ggg tcg ggc ggc ctc ggt cgg
gly phe phe gly ser gly arg trp gly gly arg gln leu gly ser gly gly leu gly arg
601/201                               631/211
ttc gtt gtc ggt gcc gca ggc ctg ggc cgc ggc caa cca ggc agt cac ccc ggc ggc gcg
phe val val gly ala ala gly leu gly arg gly gln pro gly ser his pro gly gly ala
661/221                               691/231
ggc gct gcc gct gac cag cct gac cag cgc cgc gga aag agg gcc cgg gca gat gct ggg
gly ala ala ala asp gln pro asp gln arg arg gly lys arg ala arg ala asp ala gly
721/241                               751/251
cgg gct gcc ggt ggg gca gat ggg cgc cag ggc cgg tgg tgg gct cag tgg tgt gct gcg
arg ala ala gly gly ala asp gly arg gln gly arg trp trp ala gln trp cys ala ala
781/261                               811/271
tgt tcc gcc gcg acc cta tgt gat gcc gca ttc tcc ggc ggc cgg cta gga gag ggg gcg
cys ser ala ala thr leu cys asp ala ala phe ser gly gly arg leu gly glu gly ala
841/281
cag act gtc gtt att tga
gln thr val val ile OPA

```

SEQ ID N° 5F

FIGURE 5F

17/185

séquence Rv1196 prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et pouvant coder pour une ORF en fusion avec Seq5A'

```

1/1                               31/11
atg gtg gat ttc ggg gcg tta cca ccg gag atc aac tcc gcg agg atg tac gcc ggc ccg
Met val asp phe gly ala leu pro pro glu ile asn ser ala arg met tyr ala gly pro
61/21                               91/31
ggg tgg gcc tgg ctg gtg gcc gcg gct cag atg tgg gac agc gtg gcg agt gac ctg ttt
gly ser ala ser leu val ala ala ala gln met trp asp ser val ala ser asp leu phe
121/41                               151/51
tcg gcc gcg tgg gcg ttt cag tgg gtg gtc tgg ggt ctg acg gtg ggg tgg ata ggt
ser ala ala ser ala phe gln ser val val trp gly leu thr val gly ser trp ile gly
181/61                               211/71
tcg tgg gcg ggt ctg atg gtg gcg gcg gcc tgg ccg tat gtg gcg tgg atg agc gtc acc
ser ser ala gly leu met val ala
ala ala ser pro tyr val ala trp met ser val thr
241/81                               271/91
gcg ggg cag gcc gag ctg acc gcc gcc cag gtc ccg gtt gct gcg gcg gcc tac gag acc
ala gly gln ala glu leu thr ala ala gln val arg val ala ala ala ala tyr glu thr
301/101                               331/111
gcg tat ggg ctg acg gtg ccc ccg ccg gtg atc gcc gag aac cgt gct gaa ctg atg att
ala tyr gly leu thr val pro pro pro val ile ala glu asn arg ala glu leu met ile
361/121                               391/131
ctg ata gcg acc aac ctc ttg ggg caa aac acc ccg gcg atc gcg gtc aac gag gcc gaa
leu ile ala thr asn leu leu gly gln asn thr pro ala ile ala val asn glu ala glu
421/141                               451/151
tac ggc gag atg tgg gcc caa gac gcc gcc gcg atg ttt ggc tac gcc gcg gcg acg gcg
tyr gly glu met trp ala gln asp ala ala ala met phe gly tyr ala ala ala thr ala
481/161                               511/171
acg gcg acg gcg acg ttg ctg ccg ttc gag gag gcg ccg gag atg acc agc gcg ggt ggg
thr ala thr ala thr leu leu pro phe glu glu ala pro glu met thr ser ala gly gly
541/181                               571/191
ctc ctc gag cag gcc gcc gcg gtc gag gag gcc tcc gac acc gcc gcg gcg aac cag ttg
leu leu glu gln ala ala ala val glu glu ala ser asp thr ala ala ala asn gln leu
601/201                               631/211
atg aac aat gtg ccc cag gcg ctg caa cag ctg gcc cag ccc acg cag ggc acc acg cct
met asn asn val pro gln ala leu gln gln leu ala gln pro thr gln gly thr thr pro
661/221                               691/231
tct tcc aag ctg ggt ggc ctg tgg aag acg gtc tgg ccg cat ccg tgg ccg atc agc aac
ser ser lys leu gly gly leu trp lys thr val ser pro his arg ser pro ile ser asn
721/241                               751/251
atg gtg tgg atg gcc aac aac cac atg tgg atg acc aac tgg ggt gtg tgg atg acc aac
met val ser met ala asn asn his met ser met thr asn ser gly val ser met thr asn
781/261                               811/271
acc ttg agc tgg atg ttg aag ggc ttt gct ccg gcg gcg gcc gcc cag gcc gtg caa acc
thr leu ser ser met leu lys gly phe ala pro ala ala ala ala gln ala val gln thr
841/281                               871/291
gcg gcg caa aac ggg gtc ccg gcg atg agc tgg ctg ggc agc tgg ctg ggt tct tgg ggt
ala ala gln asn gly val arg ala met ser ser leu gly ser ser leu gly ser ser gly
901/301                               931/311
ctg ggc ggt ggg gtg gcc gcc aac ttg ggt ccg gcg gcc tgg gtc ggt tgg ttg tgg gtg
leu gly gly gly val ala ala asn leu gly arg ala ala ser val gly ser leu ser val
961/321                               991/331
ccg cag gcc tgg gcc gcg gcc aac cag gca gtc acc ccg gcg gcg ccg gcg ctg ccg ctg
pro gln ala trp ala ala ala asn gln ala val thr pro ala ala arg ala leu pro leu
1021/341                               1051/351
acc agc ctg acc agc gcc gcg gaa aga ggg ccc ggg cag atg ctg ggc ggg ctg ccg gtg
thr ser leu thr ser ala ala glu arg gly pro gly gln met leu gly gly leu pro val
1081/361                               1111/371
ggg cag atg ggc gcc agg gcc ggt ggt ggg ctc agt ggt gtg ctg cgt gtt ccg ccg cga
gly gln met gly ala arg ala gly gly gly leu ser gly val leu arg val pro pro arg
1141/381                               1171/391
ccc tat gtg atg ccg cat tct ccg gcg gcc ggc tag
pro tyr val met pro his ser pro ala ala gly AMB

```

SEQ ID N° 5R

FIGURE 5R
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

18/185

Seq 5P: ORF d'après Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant la séquence Rv1196

```

1/1
tag gga cac gta atg gtg gat ttc ggg gcg tta cca ccg gag atc aac tcc gcg agg atg
AMB gly his val met val asp phe gly ala leu pro pro glu ile asn ser ala arg met
61/21
tac gcc gcc ccg ggt tcg gcc tcg ctg gtg gcc gcg gct cag atg tgg gac agc gtg gcg
tyr ala gly pro gly ser ala ser leu val ala ala ala gln met trp asp ser val ala
121/41
agt gac ctg ttt tcg gcc gcg tcg gcg ttt cag tcg gtg gtc tgg ggt ctg acg gtg ggg
ser asp leu phe ser ala ala ser ala phe gln ser val val trp gly leu thr val gly
181/61
tcg tgg ata ggt tcg tcg gcg ggt ctg atg gtg gcg gcg gcc tcg ccg tat gtg gcg tgg
ser trp ile gly ser ser ala gly leu met val ala ala ala ser pro tyr val ala trp
241/81
atg agc gtc acc gcg ggg cag gcc gag ctg acc gcc gcc cag gtc ccg gtt gct gcg gcg
met ser val thr ala gly gln ala glu leu thr ala ala gln val arg val ala ala ala
301/101
gcc tac gag acg gcg tat ggg ctg acg gtg ccc ccg ccg gtg atc gcc gag aac cgt gct
ala tyr glu thr ala tyr gly leu thr val pro pro pro val ile ala glu asn arg ala
361/121
gaa ctg atg att ctg ata gcg acc aac ctc ttg ggg caa aac acc ccg gcg atc gcg gtc
glu leu met ile leu ile ala thr asn leu leu gly gln asn thr pro ala ile ala val
421/141
aac gag gcc gaa tac gcc gag atg tgg gcc caa gac gcc gcc gcg atg ttt ggc tac gcc
asn glu ala glu tyr gly glu met trp ala gln asp ala ala ala met phe gly tyr ala
481/161
gcg gcg acg gcg acg gcg acg gcg acg ttg ctg ccg ttc gag gag gcg ccg gag atg acc
ala ala thr ala thr ala thr ala thr leu leu pro phe glu glu ala pro glu met thr
541/181
agc gcg ggt ggg ctc ctc gag cag gcc gcc gcg gtc gag gag gcc tcc gac acc gcc gcg
ser ala gly gly leu leu glu gln ala ala ala val glu glu ala ser asp thr ala ala
601/201
gcg aac cag ttg atg aac aat gtg ccc cag ccg ctg caa cag ctg gcc cag ccc acg cag
ala asn gln leu met asn asn val pro gln ala leu gln gln leu ala gln pro thr gln
661/221
ggc acc acg cct tct tcc aag ctg ggt gcc ctg tgg aag acg gtc tcg ccg cat ccg tcg
gly thr thr pro ser ser lys leu gly gly leu trp lys thr val ser pro his arg ser
721/241
ccg atc agc aac atg gtg tcg atg gcc aac aac cac atg tcg atg acc aac tcg ggt gtg
pro ile ser asn met val ser met ala asn asn his met ser met thr asn ser gly val
781/261
tcg atg acc aac acc ttg agc tcg atg ttg aag gcc ttt gct ccg gcg gcg gcc gcc cag
ser met thr asn thr leu ser ser met leu lys gly phe ala pro ala ala ala ala gln
841/281
gcc gtg caa acc gcg gcg caa aac ggg gtc ccg gcg atg agc tcg ctg ggc agc tcg ctg
ala val gln thr ala ala gln asn gly val arg ala met ser ser leu gly ser ser leu
901/301
ggt tct tcg ggt ctg ggc ggt ggg gtg gcc gcc aac ttg ggt ccg gcg gcc tcg gtc ggt
gly ser ser gly leu gly gly gly val ala ala asn leu gly arg ala ala ser val gly
961/321
tcg ttg tcg gtg ccg cag gcc tgg gcc gcg gcc aac cag gca gtc acc ccg gcg gcg ccg
ser leu ser val pro gln ala trp ala ala ala asn gln ala val thr pro ala ala arg
1021/341
gcg ctg ccg ctg acc agc ctg acc agc gcc gcg gaa aga ggg ccc ggg cag atg ctg ggc
ala leu pro leu thr ser leu thr ser ala ala glu arg gly pro gly gln met leu gly
1081/361 1111/371
ggg ctg ccg gcg ggg cag atg ggc gcc agg gcc ggt ggt ggg ctc agt ggt gtg ctg cgt
gly leu pro val gly gln met gly ala arg ala gly gly gly leu ser gly val leu arg
1141/381
gtt ccg ccg cga ccc tat gtg atg ccg cat tct ccg gcg gcc ggc tag
val pro pro arg pro tyr val met pro his ser pro ala ala gly AMB
1171/391

```

SEQ ID N° 5P

FIGURE 5P
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

19/185

31/11
 GGA TCC TGA TGC AAG TGG TCC GGG ATT TGT CGG CAG CCA CCG CGG TCC CGT CGA CCA ACG
 gly ser OPA cys lys trp ser gly ile cys arg gln pro arg arg ser arg arg pro thr
 61/21
 TTG GTG CAT CCG GGC TGC GAG CAT GCA CGC ACC GAC CAG CGC GGC GAG CGC GGC TAG CTG
 leu val his pro gly cys glu his ala arg thr asp gln arg gly glu arg gly AMB leu
 121/41
 CTT GCC CAC TGT TCC TCC CTG CCG GCA CCA TGT GCG ACA AGC TTA AGC GCA GCA GTA CCG
 leu ala his cys ser ser leu pro ala pro cys ala thr ser leu ser ala ala val pro
 181/61
 GCG GTG CCT GGG CAT CCA GCA AAA CGG GGA GCT CAA GAA CGA TTC ATG AAC GAG GGG TCG
 ala val pro gly his pro ala lys arg gly ala gln glu arg phe met asn glu gly sec
 241/81
 TCA CCA ACG TCG AAA CCG ACG GTT GCC AGC CGG CCC ACG ATA TTG CGT GCT CGA GGG TCC
 ser pro thr ser lys pro thr val ala ser arg pro thr ile leu arg ala arg gly ser
 301/101
 GCT GTA CCC TCA CCG AAC GTG AGT CCC ACA CCG CGG AGG CGG GCG ACT CTG GCG TCG TTA
 ala val pro ser pro asn val ser pro thr pro arg arg arg ala thr leu ala ser leu
 361/121
 GCA GCC GAG CTC AAG GTG TCC CGC ACC ACT GTC TCG AAT GCT TTT AAC CGA CCG GAT CCA
 ala ala glu leu lys val ser arg thr thr val ser asn ala phe asn arg pro asp pro
 421/141
 GAA GGA GAA GAT C
 glu gly glu asp

SEQ ID N° 6A

FIGURE 6A

32/11
 GAT CCT GAT GCA AGT GGT CCG GGA TTT GTC GGC AGC CAC GGC GGT CCC GTC GAC CAA CGT
 asp pro asp ala ser gly pro gly phe val gly ser his gly gly pro val asp gln arg
 62/21
 TGG TGC ATC CGG GCT GCG AGC ATG CAC GCA CCG ACC AGC GCG GCG AGC GCG GCT AGC TGC
 trp cys ile arg ala ala ser met his ala pro thr ser ala ala ser ala ala ser cys
 122/41
 TTG CCC ACT GTT CCT CCC TGC CGG CAC CAT GTG CGA CAA GCT TAA GCG CAG CAG TAC CGG
 leu pro thr val pro pro cys arg his his val arg gln ala OCH ala gln gln tyr arg
 182/61
 CGG TGC CTG GGC ATC CAG CAA AAC GGG GAG CTC AAG AAC GAT TCA TGA ACG AGG GGT CGT
 arg cys leu gly ile gln gln asn gly glu leu lys asn asp ser OPA thr arg gly arg
 242/81
 CAC CAA CGT CGA AAC CGA CGG TTG CCA GCC GGC CCA CGA TAT TGC GTG CTC GAG GGT CCG
 his gln arg arg asn arg arg leu pro ala gly pro arg tyr cys val leu glu gly pro
 302/101
 CTG TAC CCT CAC CGA ACG TGA GTC CCA CAC CGC GGA GGC GGG CGA CTC TGG CGT CGT TAG
 leu tyr pro his arg thr OPA val pro his arg gly gly gly arg leu trp arg arg AMB
 362/121
 CAG CCG AGC TCA AGG TGT CCC GCA CCA CTG TCT CGA ATG CTT TTA ACC GAC CGG ATC CAG
 gln pro ser ser arg cys pro ala pro leu ser arg met leu leu thr asp arg ile gln
 422/141
 AAG GAG AAG ATC
 lys glu lys ile

SEQ ID N° 6B

FIGURE 6B
 FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

20/185

33/11
 ATC CTG ATG CAA GTG GTC CGG GAT TTG TCG GCA GCC ACG GCG GTC CCG TCG ACC AAC GTT
 ile leu met gln val val arg asp leu ser ala ala thr ala val pro ser thr asn val
 63/21
 GGT GCA TCC GGG CTG CGA GCA TGC ACG CAC CGA CCA GCG CGG CGA GCG CGG CTA GCT GCT
 gly ala ser gly leu arg ala cys thr his arg pro ala arg arg ala arg leu ala ala
 123/41
 TGC CCA CTG TTC CTC CCT GCC GGC ACC ATG TGC GAC AAG CTT AAG CGC AGC AGT ACC GGC
 cys pro leu phe leu pro ala gly thr met cys asp lys leu lys arg scr ser thr gly
 183/61
 GGT GCC TGG GCA TCC AGC AAA ACG GGG AGC TCA AGA ACG ATT CAT GAA CGA GGG GTC GTC
 gly ala trp ala ser ser lys thr gly ser ser arg thr ile his glu arg gly val val
 243/81
 ACC AAC GTC GAA ACC GAC GGT TGC CAG CCG GCC CAC GAT ATT GCG TGC TCG AGG GTC CGC
 thr asn val glu thr asp gly cys gln pro ala his asp ile ala cys ser arg val arg
 303/101
 TGT ACC CTC ACC GAA CGT GAG TCC CAC ACC GCG GAG GCG GGC GAC TCT GGC GTC GTT AGC
 cys thr leu thr glu arg glu ser his thr ala glu ala gly asp ser gly val val ser
 363/121
 AGC CGA GCT CAA GGT GTC CCG CAC CAC TGT CTC GAA TGC TTT TAA CCG ACC GGA TCC AGA
 ser arg ala gln gly val pro his his cys leu glu cys phe OCH pro thr gly ser arg
 423/141
 AGG AGA AGA TC
 arg arg arg

SEQ ID N° 6C

FIGURE 6C

31/11
 CCG TCG GCA ACT TGG CCG CTG AGG TCG GCT TGA TCC CTG GGC CGA GGC GGG TCA GCC AAT
 pro ser ala thr trp pro leu arg ser ala OPA ser leu gly arg gly gly ser ala asn
 61/21
 AGC GGC TCC ATC GGC TTT GCT GGT AGC GGT TCG GCG GGA AGC TAG CCG CGA CGT TGT CCG
 ser gly ser ile gly phe ala gly ser gly ser ala gly ser AMB arg arg arg cys arg
 121/41
 TGG CCG GTG ATA TAT TCG GTC AGA CCG GTA TGG CCG CCG CTG AGG TGA TCT GCG ACA CGC
 trp pro val ile tyr trp val arg arg val trp arg arg leu arg OPA ser ala thr arg
 181/61
 CGC CGC GGT GCT CGA GCC AGG CTT ACG ACC AGG GAA TTT CGA AAA TGT TAT TCA GAA CAT
 arg arg gly ala arg ala arg leu thr thr arg glu phe arg lys cys tyr ser glu his
 241/81
 CTT GTA TCT CTT CTC CGT GCC ACC CCC TAG GTG TAG TGT TTT CGA GTA CCG GCA GAT CCC
 leu val ser leu leu arg ala thr pro AMB val AMB cys phe arg val pro ala asp pro
 301/101
 AGG TTC ACC AGG TCT CAC CAG ATC
 arg phe thr arg ser his gln ile

SEQ ID N° 7A

FIGURE 7A

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

21/185

32/11

CGT CGG CAA CTT GGC CGC TGA GGT CGG CTT GAT CCC TGG GCC GAG GCG GGT CAG CCA ATA
 arg arg gln leu gly arg OPA gly arg leu asp pro trp ala glu ala gly gln pro ile
 62/21
 GCG GCT CCA TCG GCT TTG CTG GTA GCG GTT CGG CGG GAA GCT AGC GGC GAC GTT GTC GGT
 ala ala pro ser ala leu leu val ala val arg arg glu ala ser gly asp val val gly
 122/41
 GGC CGG TGA TAT ATT GGG TCA GAC GGG TAT GGC GGC GGC TGA GGT GAT CTG CGA CAC GCC
 gly arg OPA tyr ile gly ser asp gly tyr gly gly gly OPA gly asp leu arg his ala
 182/61
 GCC GCG GTG CTC GAG CCA GGC TTA CGA CCA GGG AAT TTC GAA AAT GTT ATT CAG AAC ATC
 ala ala val leu glu pro gly leu arg pro gly asn phe glu asn val ile gln asn ile
 242/81
 TTG TAT CTC TTC TCC GTG CCA CCC CCT AGG TGT AGT GTT TTC GAG TAC CGG CAG ATC CCA
 leu tyr leu phe ser val pro pro pro arg cys ser val phe glu tyr arg gln ile pro
 302/101
 GGT TCA CCA GGT CTC ACC AGA TC
 gly ser pro gly leu thr arg

SEQ ID N° 7B

FIGURE 7B

33/11

GTC GGC AAC TTG GCC GCT GAG GTC GGC TTG ATC CCT GGG CCG AGG CGG GTC AGC CAA TAG
 val gly asn leu ala ala glu val gly leu ile pro gly pro arg arg val ser gln AMB
 63/21
 CGG CTC CAT CGG CTT TGC TGG TAG CGG TTC GGC GGG AAG CTA GCG GCG ACG TTG TCG GTG
 arg leu his arg leu cys trp AMB arg phe gly gly lys leu ala ala thr leu ser val
 123/41
 GCC GGT GAT ATA TTG GGT CAG ACG GGT ATG GCG GCG GCT GAG GTG ATC TGC GAC ACG CCG
 ala gly asp ile leu gly gln thr gly met ala ala ala glu val ile cys asp thr pro
 183/61
 CCG CGG TGC TCG AGC CAG GCT TAC GAC CAG GGA ATT TCG AAA ATG TTA TTC AGA ACA TCT
 pro arg cys ser ser gln ala tyr asp gln gly ile ser lys met leu phe arg thr ser
 243/81
 TGT ATC TCT TCT CCG TGC CAC CCC CTA GGT GTA GTG TTT TCG AGT ACC GGC AGA TCC CAG
 cys ile ser ser pro cys his pro leu gly val val phe ser ser thr gly arg ser gln
 303/101
 GTT CAC CAG GTC TCA CCA GAT C
 val his gln val ser pro asp

SEQ ID N° 7C

FIGURE 7C

22/185

31/11
 CTT TGC GTG ATG TCC AAT GGC GAA AAC GAC GCC TTG TCA TCG CAA TCG TCA GCA CCG GCC
 leu cys val met ser asn gly glu asn asp ala leu ser ser gln ser ser ala pro ala
 61/21
 TAG TTT TCG CGA TGA CGC TCG TTC TGA CCG GAC TTG TGA ACG GGT TTC GGG TCG AGG CCG
 AMB phe ser arg OPA arg ser phe OPA pro asp leu OPA thr gly phe gly ser arg pro
 121/41
 AGC GAA CCG TCG ATT CCA TGG GTG TCG ACG CAT TCG TGG TCA AGG CCG GCG CGG CAG GAC
 ser glu pro ser ile pro trp val ser thr his ser trp ser arg pro ala arg gln asp
 181/61
 CGT TCC TGG GTT CGA CAC CAT TCG CCC AAA TCG ACC TGC CCC AGG TTG CTC GTG CGC CTG
 arg ser trp val arg his his ser pro lys ser thr cys pro arg leu leu val arg leu
 241/81
 GCG TCT TGG CTG CCG CCC CAC TAG CGA CTG CGC CGT CGA CGA TCC GGC AGG GCA CGT CAG
 ala ser trp leu pro pro his AMB arg leu arg arg arg arg ser gly arg ala arg gln
 301/101
 CGC GAA ACG TCA CCG CGT TCG GGG CAC CAG AGC ACG GAC CCG GCA TGC CGC GGG TCT CGG
 arg glu thr ser pro arg ser gly his gln ser thr asp pro ala cys arg gly ser arg
 361/121
 ACG GTC GGG CGC CAT CGA CGC CGG ACG AGG TCG CGG TGT CGA GCA CGC TGG GCC GAA ACC
 thr val gly arg his arg arg arg thr arg ser arg cys arg ala arg trp ala glu thr
 421/141
 TCG GCG ACG ATC
 ser ala thr ile

SEQ ID N° 8A

FIGURE 8A

32/11
 TTT GCG TGA TGT CCA ATG GCG AAA ACG ACG CCT TGT CAT CGC AAT CGT CAG CAC CGG CCT
 phe ala OPA cys pro met ala lys thr thr pro cys his arg asn arg gln his arg pro
 62/21
 AGT TTT CGC GAT GAC GCT CGT TCT GAC CGG ACT TGT GAA CGG GTT TCG GGT CGA GGC CGA
 ser phe arg asp asp ala arg ser asp arg thr cys glu arg val ser gly arg gly arg
 122/41
 GCG AAC CGT CGA TTC CAT GGG TGT CGA CGC ATT CGT GGT CAA GGC CGG CGC GGC AGG ACC
 ala asn arg arg phe his gly cys arg arg ile arg gly gln gly arg arg gly arg thr
 182/61
 GTT CCT GGG TTC GAC ACC ATT CGC CCA AAT CGA CCT GCC CCA GGT TGC TCG TGC GCC TGG
 val pro gly phe asp thr ile arg pro asn arg pro ala pro gly cys ser cys ala trp
 242/81
 CGT CTT GGC TGC CGC CCC ACT AGC GAC TGC GCC GTC GAC GAT CCG GCA GGG CAC GTC AGC
 arg leu gly cys arg pro thr ser asp cys ala val asp asp pro ala gly his val ser
 302/101
 GCG AAA CGT CAC CGC GTT CGG GGC ACC AGA GCA CGG ACC CGG CAT GCC GCG GGT CTC GGA
 ala lys arg his arg val arg gly thr arg ala arg thr arg his ala ala gly leu gly
 362/121
 CGG TCG GGC GCC ATC GAC GCC GGA CGA GGT CGC GGT GTC GAG CAC GCT GGG CCG AAA CCT
 arg ser gly ala ile asp ala gly arg gly arg gly val glu his ala gly pro lys pro
 422/141
 CGG CGA CGA TC
 arg arg arg

SEQ ID N° 8B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

23/185

33/11
 TTG CGT GAT GTC CAA TGG CGA AAA CGA CGC CTT GTC ATC GCA ATC GTC AGC ACC GGC CTA
 leu arg asp val gln trp arg lys arg arg leu val ile ala ile val ser thr gly leu
 63/21
 93/31
 GTT TTC GCG ATG ACG CTC GTT CTG ACC GGA CTT GTG AAC GGG TTT CGG GTC GAG GCC GAG
 val phe ala met thr leu val leu thr gly leu val asn gly phe arg val glu ala glu
 123/41
 153/51
 CGA ACC GTC GAT TCC ATG GGT GTC GAC GCA TTC GTG GTC AAG GCC GGC GCG GCA GGA CCG
 arg thr val asp ser met gly val asp ala phe val val lys ala gly ala ala gly pro
 183/61
 213/71
 TTC CTG GGT TCG ACA CCA TTC GCC CAA ATC GAC CTG CCC CAG GTT GCT CGT GCG CCT GGC
 phe leu gly ser thr pro phe ala gln ile asp leu pro gln val ala arg ala pro gly
 243/81
 273/91
 GTC TTG GCT GCC GCC CCA CTA GCG ACT GCG CCG TCG ACG ATC CGG CAG GGC ACG TCA GCG
 val leu ala ala ala pro leu ala thr ala pro ser thr ile arg gln gly thr ser ala
 303/101
 333/111
 CGA AAC GTC ACC GCG TTC GGG GCA CCA GAG CAC GGA CCC GGC ATG CCG CGG GTC TCG GAC
 arg asn val thr ala phe gly ala pro glu his gly pro gly met pro arg val ser asp
 363/121
 393/131
 GGT CGG GCG CCA TCG ACG CCG GAC GAG GTC GCG GTG TCG AGC ACG CTG GGC CGA AAC CTC
 gly arg ala pro ser thr pro asp glu val ala val ser ser thr leu gly arg asn leu
 423/141
 GGC GAC GAT C
 gly asp asp

SEQ ID N° 8C

FIGURE 8C

partie de la séquence nucléotidique de seq8A

1/1 31/11
 CAG GTT GCT CGT GCG CCT GGC GTC TTG GCT GCC GCC CCA CTA GCG ACT GCG CCG TCG ACG
 gln val ala arg ala pro gly val leu ala ala ala pro leu ala thr ala pro ser thr
 61/21 91/31
 ATC CGG CAG GGC ACG TCA GCG CGA AAC GTC ACC GCG TTC GGG GCA CCA GAG CAC GGA CCC
 ile arg gln gly thr ser ala arg asn val thr ala phe gly ala pro glu his gly pro
 121/41 151/51
 GGC ATG CCG CGG GTC TCG GAC GGT CCG GCG CCA TCG ACG CCG GAC GAG GTC GCG GTG TCG
 gly met pro arg val ser asp gly arg ala pro ser thr pro asp glu val ala val ser
 181/61
 AGC ACG CTG GGC CGA AAC CTC GGC GAC GAT C
 ser thr leu gly arg asn leu gly asp asp

SEQ ID N° 8A'

FIGURE 8A'

24/185

1/1 31/11
 AGG TTG CTC GTG CGC CTG GCG TCT TGG CTG CCG CCC CAC TAG CGA CTG CGC CGT CGA CGA
 arg leu leu val arg leu ala ser trp leu pro pro his AMB arg leu arg arg arg arg
 61/21 91/31
 TCC GGC AGG GCA CGT CAG CGC GAA ACG TCA CCG CGT TCG GGG CAC CAG AGC ACG GAC CCG
 ser gly arg ala arg gln arg glu thr ser pro arg ser gly his gln ser thr asp pro
 121/41 151/51
 GCA TGC CGC GGG TCT CGG ACG GTC GGG CGC CAT CGA CGC CGG ACG AGG TCG CGG TGT CGA
 ala cys arg gly ser arg thr val gly arg his arg arg arg thr arg ser arg cys arg
 181/61
 GCA CGC TGG GCC GAA ACC TCG GCG ACG ATC
 ala arg trp ala glu thr ser ala thr ile

SEQ ID N° 8B'

FIGURE 8B'

Seq8C

1/1 31/11
 CCA GGT TGC TCG TGC GCC TGG CGT CTT GGC TGC CGC CCC ACT AGC GAC TGC GCC GTC GAC
 pro gly cys ser cys ala trp arg leu gly cys arg pro thr ser asp cys ala val asp
 61/21 91/31
 GAT CCG GCA GGG CAC GTC AGC GCG AAA CGT CAC CGC GTT CCG GGC ACC AGA GCA CGG ACC
 asp pro ala gly his val ser ala lys arg his arg val arg gly thr arg ala arg thr
 121/41 151/51
 CGG CAT GCC GCG GGT CTC GGA CGG TCG GGC GCC ATC GAC GCC GGA CGA GGT CGC GGT GTC
 arg his ala ala gly leu gly arg ser gly ala ile asp ala gly arg gly arg gly val
 181/61
 GAG CAC GCT GGG CCG AAA CCT CGG CGA CGA TC
 glu his ala gly pro lys pro arg arg arg

SEQ ID N° 8C'

FIGURE 8C'

25/185

séquence Rv2563 prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq8A'

```

atg
met
121/41
ctt ttt gcg gct ttg cgt gat gtc caa tgg cga aaa cga cgc ctt gtc atc gca atc gtc
leu phe ala ala leu arg asp val gln trp arg lys arg arg leu val ile ala ile val
181/61
agc acc ggc cta gtt ttc gcg atg acg ctc gtt ctg acc gga ctt gtg aac ggg ttt cgg
ser thr gly leu val phe ala met thr leu val leu thr gly leu val asn gly phe arg
241/81
gtc gag gcc gag cga acc gtc gat tcc atg ggt gtc gac gca ttc gtg gtc aag gcc ggc
val glu ala glu arg thr val asp ser met gly val asp ala phe val val lys ala gly
301/101
gcg gca gga cgg ttc ctg ggt tcg aca cca ttc gcc caa atc gac ctg ccc cag gtt gct
ala ala gly pro phe leu gly ser thr pro phe ala gln ile asp leu pro gln val ala
361/121
cgt gcg cct ggc gtc ttg gct gcc gcc cca cta gcg act gcg ccg tcg acg atc cgg cag
arg ala pro gly val leu ala ala ala pro leu ala thr ala pro ser thr ile arg gln
421/141
ggc acg tca gcg cga aac gtc acc gcg ttc ggg gca cca gag cac gga ccc ggc atg ccg
gly thr ser ala arg asn val thr ala phe gly ala pro glu his gly pro gly met pro
481/161
cgg gtc tcg gac ggt cgg gcg cca tcg acg ccg gac gag gtc gcg gtg tcg agc acg ctg
arg val ser asp gly arg ala pro ser thr pro asp glu val ala val ser ser thr leu
541/181
ggc cga aac ctc ggc gac gat ctg caa gtg ggt gcg cgc act ttg cgg atc gtc ggc atc
gly arg asn leu gly asp asp leu gln val gly ala arg thr leu arg ile val gly ile
601/201
gtg ccc gag tca acc gcg ctg gca aag att ccc aac atc ttc ctg acc acc gaa ggc cta
val pro glu ser thr ala leu ala lys ile pro asn ile phe leu thr thr glu gly leu
661/221
cag cag ttg gca tac aac gga cag ccg aca atc agt tcg atc ggg atc gac ggg atg ccc
gln gln leu ala tyr asn gly gln pro thr ile ser ser ile gly ile asp gly met pro
721/241
cga cag ctc ccg gac ggc tat cag acc gtc aat cga gcg gat gct gtc agc gat ctg atg
arg gln leu pro asp gly tyr gln thr val asn arg ala asp ala val ser asp leu met
781/261
cgc ccg ttg aag gtc gcg gtg gat gcg atc acg gtt gtg gcg gtc ttg ctg tgg atc gtt
arg pro leu lys val ala val asp ala ile thr val val ala val leu leu trp ile val
841/281
gcg gcg ttg atc gtc ggc tcg gtg gtc tac ctc tct gcg ttg gag ccg ctg cgt gac ttt
ala ala leu ile val gly ser val val tyr leu ser ala leu glu arg leu arg asp phe
901/301
gcg gtg ttc aag gcg atc ggc gtg ccg acg cgc tcg att ctg gcc ggg ctg gcg ctg cag
ala val phe lys ala ile gly val pro thr arg ser ile leu ala gly leu ala leu gln
961/321
gcg gtc gtc gtc gcg ctg ctc gcg gcg gtg gtt ggc ggc atc ctt tcg ctg ctg ttg gcg
ala val val val ala leu leu ala ala val val gly gly ile leu ser leu leu leu ala
1021/341
ccg ttg ttc ccg atg act gtc gtg gta ccc ctg agt gcc ttc gtg gcg cta ccg gcg atc
pro leu phe pro met thr val val val pro leu ser ala phe val ala leu pro ala ile
1081/361
gcg act gtg atc ggt ctg ctg gcc agc gtc gca gga ctg ccg cgc gtg gtg gcg atc gat
ala thr val ile gly leu leu ala ser val ala gly leu arg arg val val ala ile asp
1141/381
ccg gca cta gcg ttc gga ggt ccc tag
pro ala leu ala phe gly gly pro AMB

```

SEQ ID N° 8D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

26/185

ORF prédite par_Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant Rv2563

1/1
 tag gtt tca aga agg cct gtg cag gtt tcc gca gcc tgg gcc gcg cca ccg aag agc
 AMB val ser arg arg pro val gln val ser ala ala trp ala ala ala pro pro lys ser
 61/21
 ccg ccg aaa tgg gct aat ccg gtt cgc ttg gct cga tcg ccg atg atc tcg acc gcc acg
 pro pro lys trp ala asn arg val arg leu ala arg ser pro met ile ser thr ala thr
 121/41
 acc gac ccc ctc acc tcg gtc gaa cct ccg cga acc aac gcg gca acg cca gcc cat gat
 thr asp pro leu thr ser val glu pro arg arg thr asn ala ala thr pro ala his asp
 181/61
 cat ttg att ggg tcc acg gaa gca ggt agc ttc cgt cgc atg ctt ttt gcg gct ttg cgt
 his leu ile gly ser thr glu ala gly ser phe arg arg met leu phe ala ala leu arg
 241/81
 gat gtc caa tgg cga aaa cga cgc ctt gtc atc gca atc gtc agc acc gcc cta gtt ttc
 asp val gln trp arg lys arg arg leu val ile ala ile val ser thr gly leu val phe
 301/101
 gcg atg acg ctc gtt ctg acc gga ctt gtg aac ggg ttt ccg gtc gag gcc gag cga acc
 ala met thr leu val leu thr gly leu val asn gly phe arg val glu ala glu arg thr
 361/121
 gtc gat tcc atg ggt gtc gac gca ttc gtg gtc aag gcc gcc gcg gca gga ccg ttc ctg
 val asp ser met gly val asp ala phe val val lys ala gly ala ala gly pro phe leu
 421/141
 ggt tcg aca cca ttc gcc caa atc gac ctg ccc cag gtt gct cgt gcg cct gcc gtc ttg
 gly ser thr pro phe ala gln ile asp leu pro gln val ala arg ala pro gly val leu
 481/161
 gct gcc gcc cca cta gcg act gcg ccg tcg acc atc cgg cag gcc acg tca gcg cga aac
 ala ala ala pro leu ala thr ala pro ser thr ile arg gln gly thr ser ala arg asn
 541/181
 gtc acc gcg ttc ggg gca cca gag cac gga ccc gcc atg ccg ccg gtc tcg gac ggt ccg
 val thr ala phe gly ala pro glu his gly pro gly met pro arg val ser asp gly arg
 601/201
 gcg cca tcg acg ccg gac gag gtc gcg gtg tcg agc acg ctg gcc cga aac ctc gcc gac
 ala pro ser thr pro asp glu val ala val ser ser thr leu gly arg asn leu gly asp
 661/221
 gat ctg caa gtg ggt gcg cgc act ttg ccg atc gtc gcc atc gtg ccc gag tca acc gcg
 asp leu gln val gly ala arg thr leu arg ile val gly ile val pro glu ser thr ala
 721/241
 ctg gca aag att ccc aac atc ttc ctg acc acc gaa gcc cta cag cag ttg gca tac aac
 leu ala lys ile pro asn ile phe leu thr thr glu gly leu gln gln leu ala tyr asn
 781/261
 gga cag ccg aca atc agt tcg atc ggg atc gac ggg atg ccc cga cag ctc ccg gac gcc
 gly gln pro thr ile ser ser ile gly ile asp gly met pro arg gln leu pro asp gly
 841/281
 tat cag acc gtc aat cga gcg gat gct gtc agc gat ctg atg cgc ccg ttg aag gtc gcg
 tyr gln thr val asn arg ala asp ala val ser asp leu met arg pro leu lys val ala
 901/301
 gtg gat gcg atc acg gtt gtg gcg gtc ttg ctg tgg atc gtt gcg gcg ttg atc gtc gcc
 val asp ala ile thr val val ala val leu leu trp ile val ala ala leu ile val gly
 961/321
 tcg gtg gtc tac ctc tct gcg ttg gag ccg ctg cgt gac ttt gcg gtg ttc aag gcg atc
 ser val val tyr leu ser ala leu glu arg leu arg asp phe ala val phe lys ala ile
 1021/341
 gcc gtg ccg acg cgc tcg att ctg gcc ggg ctg gcg ctg cag gcg gtc gtc gtc gcg ctg
 gly val pro thr arg ser ile leu ala gly leu ala leu gln ala val val val ala leu
 1081/361
 ctc gcg gcg gtg gtt gcc gcc atc ctt tcg ctg ctg ttg gcg ccg ttg ttc ccg atg act
 leu ala ala val val gly gly ile leu ser leu leu leu ala pro leu phe pro met thr
 1141/381
 gtc gtg gta ccc ctg agt gcc ttc gtg gcg cta ccg gcg atc gcg act gtg atc ggt ctg
 val val val pro leu ser ala phe val ala leu pro ala ile ala thr val ile gly leu
 1201/401
 ctg gcc agc gtc gca gga ctg ccg cgc gtg gtg gcg atc gat ccg gca cta gcg ttc gga
 leu ala ser val ala gly leu arg arg val val ala ile asp pro ala leu ala phe gly
 1261/421
 ggt ccc tag
 gly pro AMB

SEQ ID N° 8F

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

27/185

séquence de Rv0072 prédite par par Cole et al. (Nature 393:537-544) et
présentant plus de 77% de similarité avec Seq8D'

```

1/1                               31/11
atg ctc ttc gcg gcc ctg cgt gac atg caa tgg aga aag cgc cgc ctg gtc atc acg atc
Met leu phe ala ala leu arg asp met gln trp arg lys arg arg leu val ile thr ile
61/21                               91/31
atc agc acc ggg ctg atc ttc ggg atg acg ctt gtt ttg acc gga ctc gcg aac ggc ttc
ile ser thr gly leu ile phe gly met thr leu val leu thr gly leu ala asn gly phe
121/41                              151/51
cgg gtg gag gcc cgg cac acc gtc gat tcc atg ggt gtc gat gta ttc gtc gtc aga tcc
arg val glu ala arg his thr val asp ser met gly val asp val phe val val arg ser
181/61                              211/71
ggc gct gct gga cct ttt ctg ggt tca ata ccg ttt ccc gat gtt gac ctg gcc cga gtg
gly ala ala gly pro phe leu gly ser ile pro phe pro asp val asp leu ala arg val
241/81                              271/91
gcc gct gaa ccc ggt gtc atg gcc gcg gcc ccg ttg ggc agc gtg ggg acg atc atg aaa
ala ala glu pro gly val met ala ala ala pro leu gly ser val gly thr ile met lys
301/101                             331/111
gaa ggc acg tcg acg cga aac gtc acg gtc ttc ggc gcg ccc gag cac gga cct ggc atg
glu gly thr ser thr arg asn val thr val phe gly ala pro glu his gly pro gly met
361/121                             391/131
cca cgg gtc tca gag ggt cgg tca ccg tcg aaa ccg gac gaa gtc gcg gca tcg agc acg
pro arg val ser glu gly arg ser pro ser lys pro asp glu val ala ala ser ser thr
421/141                             451/151
atg ggc cga cac ctc ggt gac act gtc gag gtc ggc gcg cgc aga ttg cgg gtc gtt ggc
met gly arg his leu gly asp thr val glu val gly ala arg arg leu arg val val gly
481/161                             511/171
att gtg ccg aat tcc acc gcg ctg gcc aag atc ccc aat gtc ttc ctc acg acc gag ggc
ile val pro asn ser thr ala leu ala lys ile pro asn val phe leu thr thr glu gly
541/181                             571/191
tta cag aaa ttg gcg tac aac ggg cag ccg aat atc acg tcc atc ggg atc ata ggt atg
leu gln lys leu ala tyr asn gly gln pro asn ile thr ser ile gly ile ile gly met
601/201                             631/211
ccc cga cag ctg ccg gag ggt tac cag act ttc gat ccg gtg ggc gct gtc aat gat ttg
pro arg gln leu pro glu gly tyr gln thr phe asp arg val gly ala val asn asp leu
661/221                             691/231
gtg cgc cca ttg aag gtc gca gtg aat tcg atc tcg atc gtg gct gtt ttg ctg tgg att
val arg pro leu lys val ala val asn ser ile ser ile val ala val leu leu trp ile
721/241                             751/251
gtg gcg gtg ctg atc gtc ggc tcg gtg gtg tac ctt tcg gct ctt gag cgg cta cgt gac
val ala val leu ile val gly ser val val tyr leu ser ala leu glu arg leu arg asp
781/261                             811/271
ttc gcg gtg ttc aag gcg att ggc acg cca acg cgc tcg att atg gcc ggg ctc gca tta
phe ala val phe lys ala ile gly thr pro thr arg ser ile met ala gly leu ala leu
841/281                             871/291
cag gcg ctg gtc att gcg ttg ctt gcg gcg gtg gtg ggc gtc gtc ctg gcg cag gtg ttg
gln ala leu val ile ala leu leu ala ala val val gly val val leu ala gln val leu
901/301                             931/311
gca cca ctg ttt ccg atg att gtc gcg gta ccc gtc ggt gct tac ctg gcg cta ccg gtg
ala pro leu phe pro met ile val ala val pro val gly ala tyr leu ala leu pro val
961/321                             991/331
gcc gcg atc gtc atc ggt ctg ttc gct agt gtt gcc gga ttg aag cgc gtg gtg acg gtc
ala ala ile val ile gly leu phe ala ser val ala gly leu lys arg val val thr val
1021/341
gat ccc gcg cag gcg ttc gga ggt ccc tag
asp pro ala gln ala phe gly gly pro AMB

```

SEQ ID N° 8G

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

28/185

Seq8H : ORF prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq8G

1/1 31/11

tag cct ctg gga atg ctc ttc gcg gcc ctg cgt gac atg caa tgg aga aag cgc cgc ctg
 AMB pro leu gly met leu phe ala ala leu arg asp met gln trp arg lys arg arg leu
 61/21 91/31

gtc atc acg atc atc agc acc ggg ctg atc ttc ggg atg acg ctt gtt ttg acc gga ctc
 val ile thr ile ile ser thr gly leu ile phe gly met thr leu val leu thr gly leu
 121/41 151/51

gcg aac ggc ttc cgg gtg gag gcc cgg cac acc gtc gat tcc atg ggt gtc gat gta ttc
 ala asn gly phe arg val glu ala arg his thr val asp ser met gly val asp val phe
 181/61 211/71

gtc gtc aga tcc ggc gct gct gga cct ttt ctg ggt tca ata ccg ttt ccc gat gtt gac
 val val arg ser gly ala ala gly pro phe leu gly ser ile pro phe pro asp val asp
 241/81 271/91

ctg gcc cga gtg gcc gct gaa ccc ggt gtc atg gcc gcg gcc ccg ttg ggc agc gtg ggg
 leu ala arg val ala ala glu pro gly val met ala ala ala pro leu gly ser val gly
 301/101 331/111

acg atc atg aaa gaa ggc acg tcg acg cga aac gtc acg gtc ttc ggc gcg ccc gag cac
 thr ile met lys glu gly thr ser thr arg asn val thr val phe gly ala pro glu his
 361/121 391/131

gga cct ggc atg cca cgg gtc tca gag ggt cgg tca ccg tcg aaa ccg gac gaa gtc gcg
 gly pro gly met pro arg val ser glu gly arg ser pro ser lys pro asp glu val ala
 421/141 451/151

gca tcg agc acg atg ggc cga cac ctc ggt gac act gtc gag gtc ggc gcg cgc aga ttg
 ala ser ser thr met gly arg his leu gly asp thr val glu val gly ala arg arg leu
 481/161 511/171

cgg gtc gtt ggc att gtg ccg aat tcc acc gcg ctg gcc aag atc ccc aat gtc ttc ctc
 arg val val gly ile val pro asn ser thr ala leu ala lys ile pro asn val phe leu
 541/181 571/191

acg acc gag ggc tta cag aaa ttg gcg tac aac ggg cag ccg aat atc acg tcc atc ggg
 thr thr glu gly leu gln lys leu ala tyr asn gly gln pro asn ile thr ser ile gly
 601/201 631/211

atc ata ggt atg ccc cga cag ctg ccg gag ggt tac cag act ttc gat ccg gtg ggc gct
 ile ile gly met pro arg gln leu pro glu gly tyr gln thr phe asp arg val gly ala
 661/221 691/231

gtc aat gat ttg gtg cgc cca ttg aag gtc gca gtg aat tcg atc tcg atc gtg gct gtt
 val asn asp leu val arg pro leu lys val ala val asn ser ile ser ile val ala val
 721/241 751/251

ttg ctg tgg att gtg gcg gtg ctg atc gtc ggc tcg gtg gtg tac ctt tcg gct ctt gag
 leu leu trp ile val ala val leu ile val gly ser val val tyr leu ser ala leu glu
 781/261 811/271

cgg cta cgt gac ttc gcg gtg ttc aag gcg att ggc acg cca acg cgc tcg att atg gcc
 arg leu arg asp phe ala val phe lys ala ile gly thr pro thr arg ser ile met ala
 841/281 871/291

ggg ctc gca tta cag gcg ctg gtc att gcg ttg ctt gcg gcg gtg gtg ggc gtc gtc ctg
 gly leu ala leu gln ala leu val ile ala leu leu ala ala val val gly val val leu
 901/301 931/311

gcg cag gtg ttg gca cca ctg ttt ccg atg att gtc gcg gta ccc gtc ggt gct tac ctg
 ala gln val leu ala pro leu phe pro met ile val ala val pro val gly ala tyr leu
 961/321 991/331

gcg cta ccg gtg gcc gcg atc gtc atc ggt ctg ttc gct agt gtt gcc gga ttg aag cgc
 ala leu pro val ala ala ile val ile gly leu phe ala ser val ala gly leu lys arg
 1021/341 1051/351

gtg gtg acg gtc gat ccc gcg cag gcg ttc gga ggt ccc tag
 val val thr val asp pro ala gln ala phe gly gly pro AMB

SEQ ID N° 8H

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

29/185

31/11
 CGA GGC CGA GCG AAC CGT CGA TTC CAT GGG TGT CGA CGC ATT CGT GGT CAA GGC CGG CGC
 arg gly arg ala asn arg arg phe his gly cys arg arg ile arg gly gln gly arg arg
 61/21
 GGC AGG ACC GTT CCT GGG TTC GAC ACC ATT CGC CCA AAT CGA CCT GCC CCA GGT TGC TCG
 gly arg thr val pro gly phe asp thr ile arg pro asn arg pro ala pro gly cys ser
 121/41
 TGC GCC TGG CGT CTT GGC TGC CGC CCC ACT AGC GAC TGC GCC GTC GAC GAT CCG GCA GGG
 cys ala trp arg leu gly cys arg pro thr ser asp cys ala val asp asp pro ala gly
 181/61
 CAC GTC AGC GCG AAA CGT CAC CGC GTT CGG GGC ACC AGA GCA CGG ACC CGG CAT GCC GCG
 his val ser ala lys arg his arg val arg gly thr arg ala arg thr arg his ala ala
 241/81
 GGT CTC GGA CGG TCG GGC GCC ATC GAC GCC GGA CGA GGT CGC GGT GTC GAG CAC GCT GGG
 gly leu gly arg ser gly ala ile asp ala gly arg gly arg gly val glu his ala gly
 301/101
 CCG AAA CCT CGG CGA CGA TC
 pro lys pro arg arg arg

SEQ ID N° 9A

FIGURE 9A

32/11
 GAG GCC GAG CGA ACC GTC GAT TCC ATG GGT GTC GAC GCA TTC GTG GTC AAG GCC GGC GCG
 glu ala glu arg thr val asp ser met gly val asp ala phe val val lys ala gly ala
 62/21
 GCA GGA CCG TTC CTG GGT TCG ACA CCA TTC GCC CAA ATC GAC CTG CCC GAG GTT GCT CGT
 ala gly pro phe leu gly ser thr pro phe ala gln ile asp leu pro gln val ala arg
 122/41
 GCG CCT GGC GTC TTG GCT GCC GCC CCA CTA GCG ACT GCG CCG TCG ACG ATC CGG CAG GGC
 ala pro gly val leu ala ala ala pro leu ala thr ala pro ser thr ile arg gln gly
 182/61
 ACG TCA GCG CGA AAC GTC ACC GCG TTC GGG GCA CCA GAG CAC GGA CCC GGC ATG CCG CGG
 thr ser ala arg asn val thr ala phe gly ala pro glu his gly pro gly met pro arg
 242/81
 GTC TCG GAC GGT CGG GCG CCA TCG ACG CCG GAC GAG GTC GCG GTG TCG AGC ACG CTG GGC
 val ser asp gly arg ala pro ser thr pro asp glu val ala val ser ser thr leu gly
 302/101
 CGA AAC CTC GGC GAC GAT C
 arg asn leu gly asp asp

SEQ ID N° 9B

FIGURE 9B

30/185

33/11
 AGG CCG AGC GAA CCG TCG ATT CCA TGG GTG TCG ACG CAT TCG TGG TCA AGG CCG GCG CGG
 arg pro ser glu pro ser ile pro trp val ser thr his ser trp ser arg pro ala arg
 63/21 93/31
 CAG GAC CGT TCC TGG GTT CGA CAC CAT TCG CCC AAA TCG ACC TGC CCC AGG TTG CTC GTG
 gln asp arg ser trp val arg his his ser pro lys ser thr cys pro arg leu leu val
 123/41 153/51
 CGC CTG GCG TCT TGG CTG CCG CCC CAC TAG CGA CTG CGC CGT CGA CGA TCC GGC AGG GCA
 arg leu ala ser trp leu pro pro his AMB arg leu arg arg arg arg ser gly arg ala
 183/61 213/71
 CGT CAG CGC GAA ACG TCA CCG CGT TCG GGG CAC CAG AGC ACG GAC CCG GCA TGC CGC GGG
 arg gln arg glu thr ser pro arg ser gly his gln ser thr asp pro ala cys arg gly
 243/81 273/91
 TCT CGG ACG GTC GGG CGC CAT CGA CGC CGG ACG AGG TCG CGG TGT CGA GCA CGC TGG GCC
 ser arg thr val gly arg his arg arg arg thr arg ser arg cys arg ala arg trp ala
 303/101
 GAA ACC TCG GCG ACG ATC
 glu thr.ser ala thr ile

SEQ ID N° 9C

FIGURE 9C

31/11
 TTA ACG ACT CAG ACG GAA ACG CTT GAA CCG CGA GGT CGC TCC GGA CAC CAA TTT GAC TCG
 leu thr thr gln thr glu thr leu glu pro arg gly arg ser gly his gln phe asp ser
 61/21 91/31
 GCT CTT TGG CAA TTG AAG GTG AGC TGC GAG CAG CCG GGT GAC CGC ATC GTT GGC CTT GCC
 ala leu trp gln leu lys val ser cys glu gln pro gly asp arg ile val gly leu ala
 121/41 151/51
 ATC AAT CGC CGG CTC GCG GAC GTA GAT AAT CAG CTC ACC GTT GGG ACC GAC CTC GAC CAG
 ile asn arg arg leu ala asp val asp asn gln leu thr val gly thr asp leu asp gln
 181/61 211/71
 GGG TCC TTT GTG ACT GCC GGG CTT GAC GCG GAC GAC CAC AGA GTC GGT CAT CGC CTA AGG
 gly ser phe val thr ala gly leu asp ala asp asp his arg val gly his arg leu arg
 241/81 271/91
 CTA CCG TTC TGA CCT GGG GCT GCG TGG GCG CCG ACG ACG TGA GGC ACG TCA TGT CTC AGC
 leu pro phe OPA pro gly ala ala trp ala pro thr thr OPA gly thr ser cys leu ser
 301/101 331/111
 GGC CCA CCG CCA CCT CGG TCG CCG GCA GTA TGT CAG CAT GTG CAG ATG ACT CCA CGC AGC
 gly pro pro pro pro arg ser pro ala val cys gln his val gln met thr pro arg ser
 361/121 391/131
 CTT GTT CGC ATC GTT GGT GTC GTG GTT GCG ACG ACC TTG GCG CTG GTG AGC GCA CCC GCC
 leu val arg ile val gly val val val ala thr thr leu ala leu val ser ala pro ala
 421/141
 GGC GGT CGT GCC GCG CAT GCG GAT C
 gly gly arg ala ala his ala asp

SEQ ID N° 10A

FIGURE 10A

31/185

32/11
TAA CGA CTC AGA CGG AAA CGC TTG AAC CGC GAG GTC GCT CCG GAC ACC AAT TTG ACT CGG
OCH arg leu arg arg lys arg leu asn arg glu val ala pro asp thr asn leu thr arg
62/21 92/31
CTC TTT GGC AAT TGA AGG TGA GCT GCG AGC AGC CGG GTG ACC GCA TCG TTG GCC TTG CCA
leu phe gly asn OPA arg OPA ala ala ser ser arg val thr ala ser leu ala leu pro
122/41 152/51
TCA ATC GCC GGC TCG CGG ACG TAG ATA ATC AGC TCA CCG TTG GGA CCG ACC TCG ACC AGG
ser ile ala gly ser arg thr AMB ile ile ser ser pro leu gly pro thr ser thr arg
182/61 212/71
GGT CCT TTG TGA CTG CCG GGC TTG ACG CGG ACG ACC ACA GAG TCG GTC ATC GCC TAA GGC
gly pro leu OPA leu pro gly leu thr arg thr thr thr glu ser val ile ala OCH gly
242/81 272/91
TAC CGT TCT GAC CTG GGG CTG CGT GGG CGC CGA CGA CGT GAG GCA CGT CAT GTC TCA GCG
tyr arg ser asp leu gly leu arg gly arg arg arg glu ala arg his val ser ala
302/101 332/111
GCC CAC CGC GAC CTC GGT CGC CGG CAG TAT GTC AGC ATG TGC AGA TGA CTC CAC GCA GCC
ala his arg his leu gly arg arg gln tyr val ser met cys arg OPA leu his ala ala
362/121 392/131
TTG TTC GCA TCG TTG GTG TCG TGG TTG CGA CGA CCT TGG CGC TGG TGA GCG CAC CCG CCG
leu phe ala ser leu val ser trp leu arg arg pro trp arg trp OPA ala his pro pro
422/141
GCG GTC GTG CCG CGC ATG CCG ATC
ala val val pro arg met arg Ile

SEQ ID N° 10B

FIGURE 10B

33/11
AAC GAC TCA GAC GGA AAC GCT TGA ACC GCG AGG TCG CTC CGG ACA CCA ATT TGA CTC GGC
asn asp ser asp gly asn ala OPA thr ala arg ser leu arg thr pro ile OPA leu gly
63/21 93/31
TCT TTG GCA ATT GAA GGT GAG CTG CGA GCA GCC GGG TGA CCG CAT CGT TGG CCT TGC CAT
ser leu ala ile glu gly glu leu arg ala ala gly OPA pro his arg trp pro cys his
123/41 153/51
CAA TCG CCG GCT CGC GGA CGT AGA TAA TCA GCT CAC CGT TGG GAC CGA CCT CGA CCA GGG
gln ser pro ala arg gly arg arg OCH ser ala his arg trp asp arg pro arg pro gly
183/61 213/71
GTC CTT TGT GAC TGC CGG GCT TGA CGC GGA CGA CCA CAG AGT CGG TCA TCG CCT AAG GCT
val leu cys asp cys arg ala OPA arg gly arg pro gln ser arg ser ser pro lys ala
243/81 273/91
ACC GTT CTG ACC TGG GGC TGC GTG GGC GCC GAC GAC GTG AGG CAC GTC ATG TCT CAG CGG
thr val leu thr trp gly cys val gly ala asp asp val arg his val met ser gln arg
303/101 333/111
CCC ACC GCC ACC TCG GTC GCC GGC AGT ATG TCA GCA TGT GCA GAT GAC TCC ACG CAG CCT
pro thr ala thr ser val ala gly ser met ser ala cys ala asp asp ser thr gln pro
363/121 393/131
TGT TCG CAT CGT TGG TGT CGT GGT TGC GAC GAC CTT GGC GCT GGT GAG CGC ACC CGC CGG
cys ser his arg trp cys arg gly cys asp asp leu gly ala gly glu arg thr arg arg
423/141
CGG TCG TGC CGC GCA TGC GGA TC
arg ser cys arg ala cys gly

SEQ ID N° 10C

FIGURE 10C
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

32/185

31/11
 CCC GAA GAG GTC CCC CGT TTT GTT AAT TTT TAA AAA ATT TGT GTC ACA AAC CGG GGT ACC
 pro glu glu val pro arg phe val asp phe OCH lys ile cys val thr lys arg gly thr
 61/21
 AAG GCA TAA AAC CTA GTA CCT GGG GCG GCG GAT TCA ACG AAA ACC GAG TGG GGG TAG TCA
 lys ala OCH asn leu val pro gly ala ala asp ser thr lys thr glu trp gly AMB ser
 121/41
 GGG GCG TGC ATT CCG ACG ACC CTG TAC GAC CCG CTG GTG GCA ACG CCG ATG AGT GCG CCG
 gly ala cys ile pro thr thr leu tyr asp pro leu val ala thr pro met ser ala pro
 181/61
 ACG AAG GCC GAG CGA CCG GCT GCC GGC GCT GAC CGC CGC GGA AGC CGC CGA GTG CAT GGT
 thr lys ala glu arg arg ala ala gly ala asp arg arg gly ser arg arg val asp gly
 241/81
 CAC CAC CGC CCG CAC CCG ACC GGT ACG GAT CGC GCC TCG GGT TAC CGT CGC CGT CAA CGC
 his his arg pro his pro thr gly thr asp arg ala ser gly tyr arg arg arg gln arg
 301/101
 GCT GGA CAG CAT CCG TCC CCG CTG GGT CAA TGC ACT CAT GCA GCG CCG CAA CGA ACA GCT
 ala gly gln his arg ser pro leu gly gln cys thr his ala ala pro gln arg thr ala
 361/121
 CAA CCC TTG AAC CCG GTC CCG GCC TGC CGA CCC TCG GCC GCC GGC GTG CCG CTA CGT GAT
 gln pro leu asn arg val pro ala cys arg pro ser ala ala gly val pro leu arg asp
 421/141
 AGA CAC AGG GCC ATG GAA ATC CTG GCC AGC CGG ATG CTA CTT CCG CCG GCG GAC TAT CAG
 arg his arg ala met glu ile leu ala ser arg met leu leu arg pro ala asp tyr gln
 481/161
 CGG TCG CTG AGC TTC TAC CGT GAC CAG ATC
 arg ser leu ser phe tyr arg asp gln ile

SEQ ID N° 11A

FIGURE 11A

32/11
 CCG AAG AGG TCC CCC GTT TTG TTA ATT TTT AAA AAA TTT GTG TCA CAA AGC GGG GTA CCA
 pro lys arg ser pro val leu leu ile phe lys lys phe val ser gln ser gly val pro
 62/21
 AGG CAT AAA ACC TAG TAC CTG GGG CCG CGG ATT CAA CGA AAA CCG AGT GGG GGT AGT CAG
 arg his lys thr AMB tyr leu gly arg arg ile gln arg lys pro ser gly gly ser gln
 122/41
 GGG CGT GCA TTC CGA CGA CCC TGT ACG ACC CGC TGG TGG CAA CGC CGA TGA GTG CCC CGA
 gly arg ala phe arg arg pro cys thr thr arg trp trp gin arg arg OPA val arg arg
 182/61
 CGA AGG CCG AGC GAC GGG CTG CCG GCG CTG ACC GCC GCG GAA GCC GCC GAG TGG ATG GTC
 arg arg pro ser asp gly leu pro ala leu thr ala ala glu ala ala glu trp met val
 242/81
 ACC ACC GCC CGC ACC CGA CCG GTA CGG ATC GCG CCT CGG GTT ACC GTC GCC GTC ACC GCG
 thr thr ala arg thr arg pro val arg ile ala pro arg val thr val ala val asn ala
 302/101
 CTG GAC AGC ATC GGT CCC CGC TGG GTC AAT GCA CTC ATG CAG CGC CGC AAC GAA CAG CTC
 leu asp ser ile gly pro arg trp val asn ala leu met gln arg arg asn glu gln leu
 362/121
 AAC CCT TGA ACC GGG TCC CCG CCT GCC GAC CCT CGG CCG CCG GCG TGC CGC TAC GTG ATA
 asn pro OPA thr gly ser arg pro ala asp pro arg pro pro ala cys arg tyr val ile
 422/141
 GAC ACA GGG CCA TGG AAA TCC TGG CCA GCC GGA TGC TAC TTC GCC CCG CGG ACT ATC AGC
 asp thr gly pro trp lys ser trp pro ala gly cys tyr phe gly arg arg thr ile ser
 482/161
 GGT CGC TGA GCT TCT ACC GTG ACC AGA TC
 gly arg OPA ala ser thr val thr arg

SEQ ID N° 11B

FIGURE 11B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

33/185

33/11

CGA AGA GGT CCC CCG TTT TGT TAA TTT TTA AAA AAT TTG TGT CAC AAA GCG GGG TAC CAA
 arg arg gly pro pro phe cys OCH phe leu lys asn leu cys his lys ala gly tyr gln
 63/21 93/31
 GGC ATA AAA CCT AGT ACC TGG GGC GGC GGA TTC AAC GAA AAC CGA GTG GGG GTA GTC AGG
 gly ile lys pro ser thr trp gly gly gly phe asn glu asn arg val gly val val arg
 123/41 153/51
 GGC GTG CAT TCC GAC GAC CCT GTA CGA CCC GCT GGT GGC AAC GCC GAT GAG TGC GCC GAC
 gly val his ser asp asp pro val arg pro ala gly gly asn ala asp glu cys ala asp
 183/61 213/71
 GAA GGC CGA GCG ACG GGC TGC CGG CGC TGA CCG CCG CGG AAG CCG CCG AGT GGA TGG TCA
 glu gly arg ala thr gly cys arg arg OPA pro pro arg lys pro pro ser gly trp ser
 243/81 273/91
 CCA CCG CCC GCA CCC GAC CGG TAC GGA TCG CGC CTC GGG TTA CCG TCG CCG TCA ACG CGC
 pro pro pro ala pro asp arg tyr gly ser arg leu gly leu pro ser pro ser thr arg
 303/101 333/111
 TGG ACA GCA TCG GTC CCC GCT GGG TCA ATG CAC TCA TGC AGC GCC GCA ACG AAC AGC TCA
 trp thr ala ser val pro ala gly ser met his ser cys ser ala ala thr asn ser ser
 363/121 393/131
 ACC CTT GAA CCG GGT CCC GGC CTG CCG ACC CTC GGC CGC CGG CGT GCC GCT ACG TGA TAG
 thr leu glu pro gly pro gly leu pro thr leu gly arg arg arg ala ala thr OPA AMB
 423/141 453/151
 ACA CAG GGC CAT GGA AAT CCT GGC CAG CCG GAT GCT ACT TCG GCC GGC GGA CTA TCA GCG
 thr gln gly his gly asn pro gly gln pro asp ala thr ser ala gly gly leu ser ala
 483/161
 GTC GCT GAG CTT CTA CCG TGA CCA GAT C
 val ala glu leu leu pro OPA pro asp

SEQ ID N° 11C

FIGURE 11C

partie de la séquence nucléotidique de Seq11

1/1 31/11
 CGT CGC CGT CAA CGC GCT GGA CAG CAT CGG TCC CCG CTG GGT CAA TGC ACT CAT GCA GCG
 arg arg arg gln arg ala gly gln his arg ser pro leu gly gln cys thr his ala ala
 61/21 91/31
 CCG CAA CGA ACA GCT CAA CCC TTG AAC CGG GTC CCG GCC TGC CGA CCC TCG GCC GCC GGC
 pro gln arg thr ala gln pro leu asn arg val pro ala cys arg pro ser ala ala gly
 121/41 151/51
 GTG CCG CTA CGT GAT AGA CAC AGG GCC ATG GAA ATC CTG GCC AGC CGG ATG CTA CTT CGG
 val pro leu arg asp arg his arg ala met glu ile leu ala ser arg met leu leu arg
 181/61 211/71
 CCG GCG GAC TAT CAG CGG TCG CTG AGC TTC TAC CGT GAC CAG ATC
 pro ala asp tyr gln arg ser leu ser phe tyr arg asp gln ile

SEQ ID N° 11A'

FIGURE 11A'

34/185

1/1 31/11
 GTC GCC GTC AAC GCG CTG GAC AGC ATC GGT CCC CGC TGG GTC AAT GCA CTC ATG CAG CGC
 val ala val asn ala leu asp ser ile gly pro arg trp val asn ala leu met gln arg
 61/21 91/31
 CGC AAC GAA CAG CTC AAC CCT TGA ACC GGG TCC CGG CCT GCC GAC CCT CGG CCG CCG GCG
 arg asn glu gln leu asn pro OPA thr gly ser arg pro ala asp pro arg pro pro ala
 121/41 151/51
 TGC CGC TAC GTG ATA GAC ACA GGG CCA TGG AAA TCC TGG CCA GCC GGA TGC TAC TTC GGC
 cys arg tyr val ile asp thr gly pro trp lys ser trp pro ala gly cys tyr phe gly
 181/61 211/71
 CGG CGG ACT ATC AGC GGT CGC TGA GCT TCT ACC GTG ACC AGA TC
 arg arg thr ile ser gly arg OPA ala ser thr val thr arg

SEQ ID N° 11B'

FIGURE 11B'

1/1 31/11
 TCG CCG TCA ACG CGC TGG ACA GCA TCG GTC CCC GCT GGG TCA ATG CAC TCA TGC AGC GCC
 ser pro ser thr arg trp thr ala ser val pro ala gly ser met his ser cys ser ala
 61/21 91/31
 GCA ACG AAC AGC TCA ACC CTT GAA CCG GGT CCC GGC CTG CCG ACC CTC GGC CGC CGG CGT
 ala thr asn ser ser thr leu glu pro gly pro gly leu pro thr leu gly arg arg arg
 121/41 151/51
 GCC GCT ACG TGA TAG ACA CAG GGC CAT GGA AAT CCT GGC CAG CCG GAT GCT ACT TCG GCC
 ala ala thr OPA AMB thr gln gly his gly asn pro gly gln pro asp ala thr ser ala
 181/61 211/71
 GGC GGA CTA TCA GCG GTC GCT GAG CTT CTA CCG TGA CCA GAT C
 gly gly leu ser ala val ala glu leu leu pro OPA pro asp

SEQ ID N° 11C'

FIGURE 11C'

séquence Rv0546c prédite par par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant Seq11A'

1/1 31/11
 atg gaa atc ctg gcc agc cgg atg cta ctt cgg ccg gcg gac tat cag cgg tcg ctg agc
 Met glu ile leu ala ser arg met leu leu arg pro ala asp tyr gln arg ser leu ser
 61/21 91/31
 ttc tac cgt gac cag atc ggg ctg gcg att gcc cgt gaa tac ggg gcc ggc aca gtg ttt
 phe tyr arg asp gln ile gly leu ala ile ala arg glu tyr gly ala gly thr val phe
 121/41 151/51
 ttc gcc ggt cag tca ctg ctc gaa ctg gcc ggt tac ggc gag ccg gac cat tcg cgg gga
 phe ala gly gln ser leu leu glu leu ala gly tyr gly glu pro asp his ser arg gly
 181/61 211/71
 cct ttt ccc gcc gcg ctg tgg ctg cag gtg cgc gac ctc gag gct acc cag acc gag ctg
 pro phe pro gly ala leu trp leu gln val arg asp leu glu ala thr gln thr glu leu
 241/81 271/91
 gtc agc cga gcc gtg tcg atc gct cgc gag ccc cgc cgc gaa ccg tgg gcc ctg cac gag
 val ser arg gly val ser ile ala arg glu pro arg arg glu pro trp gly leu his glu
 301/101 331/111
 atg cat gtg acc gac cca gac ggg atc aca ctg ata ttc gtc gag gtt ccc gag ggt cac
 met his val thr asp pro asp gly ile thr leu ile phe val glu val pro glu gly his
 361/121
 ccg ctg cgt aca gac acc cgg gcg tga
 pro leu arg thr asp thr arg ala OPA

SEQ ID N° 11D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

35/185

ORF prédite par par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant Rv0546c

```

1/1                                31/11
tag tca ggg cgt gca ttc gac gac gct gta cta ccc gct ggt ggc aac tcc gat gat tgc
AMB ser gly arg ala phe asp asp ala val leu pro ala gly gly asn ser asp asp cys
61/21                                91/31
gcc gac gaa ggc cta cga cgg gct gcc ggc gct gac cgc cgc gga agc cgc cga gtg gat
ala asp glu gly leu arg arg ala ala gly ala asp arg arg gly ser arg arg val asp
121/41                                151/51
ggt cac cgc cgc ccg cac ccg acc ggt gcg gat cgc gcc tcg ggt tgc cgt cgc cgt caa
gly his arg arg pro his pro thr gly ala asp arg ala ser gly cys arg arg arg gln
181/61                                211/71
cgc gct gga cag cat cgg tcc ccg ctg ggt caa tgc act cat gca gcg ccg caa cga aca
arg ala gly gln his arg ser pro leu gly gln cys thr his ala ala pro gln arg thr
241/81                                271/91
gct caa ccc ttg aac cgg gtc ccg gcc tgc cga ccc tcg gcc gcc ggc gtg ccg cta cgt
ala gln pro leu asn arg val pro ala cys arg pro ser ala ala gly val pro leu arg
301/101                                331/111
gat aga cac agg gcc atg gaa atc ctg gcc agc cgg atg cta ctt cgg ccg gcg gac tat
asp arg his arg ala met glu ile leu ala ser arg met leu leu arg pro ala asp tyr
361/121                                391/131
cag cgg tcg ctg agc ttc tac cgt gac cag atc ggg ctg gcg att gcc cgt gaa tac ggg
gln arg ser leu ser phe tyr arg asp gln ile gly leu ala ile ala arg glu tyr gly
421/141                                451/151
gcc ggc aca gtg ttt ttc gcc ggt cag tca ctg ctc gaa ctg gcc ggt tac ggc gag ccg
ala gly thr val phe phe ala gly gln ser leu leu glu leu ala gly tyr gly glu pro
481/161                                511/171
gac cat tcg cgg gga cct ttt ccc gcc gcg ctg tgg ctg cag gtg cgc gac ctc gag gct
asp his ser arg gly pro phe pro gly ala leu trp leu gln val arg asp leu glu ala
541/181                                571/191
acc cag acc gag ctg gtc agc cga ggc gtg tcg atc gct cgc gag ccc cgc cgc gaa ccg
thr gln thr glu leu val ser arg gly val ser ile ala arg glu pro arg arg glu pro
601/201                                631/211
tgg ggc ctg cac gag atg cat gtg acc gac cca gac ggg atc aca ctg ata ttc gtc gag
trp gly leu his glu met his val thr asp pro asp gly ile thr leu ile phe val glu
661/221                                691/231
gtt ccc gag ggt cac ccg ctg cgt aca gac acc cgg gcg tga
val pro glu gly his pro leu arg thr asp thr arg ala OPA

```

SEQ ID N° 11F

FIGURE 11F

36/185

```

1/1                               31/11
gac cga agg gat ttc gcg act aac tcg gcc tgt aag gca acg cga ggt ctt cat gcc gag
asp arg arg asp phe ala thr asn ser ala cys lys ala thr arg gly leu his ala glu
61/21                               91/31
gac gta gac agg aag aga cag gga agc tga tga cgt cgc gta ccg gac cgc cat tct gtc
asp val asp arg lys arg gln gly ser OPA OPA arg arg val pro asp arg his ser val
121/41                               151/51
gag tct ttc cga gtt cag caa caa tcg aca cag aag cgg gga cca gac cgg gag gac gac
glu ser phe arg val gln gln gln ser thr gln lys arg gly pro asp arg glu asp asp
181/61                               211/71
gcg gcc cgg gcc gct tcg ggc cga gtg tct gag taa gac cag agt cac ggg tcc gtg tgt
ala ala arg ala ala ser gly arg val ser glu OCH asp gln ser his gly ser val cys
241/81                               271/91
gac aac cgc gcg gaa ttc aat cgg atg gcg ggc ggg acc gga ttg cgc cgg tca ccg agg
asp asn arg ala glu phe asn arg met ala gly gly thr gly leu arg arg ser pro arg
301/101
aac ctc cgg agt gat c
asn leu arg ser asp

```

SEQ ID N° 12A

FIGURE 12A

```

1/1                               31/11
acc gaa ggg att tcg cga cta act cgg cct gta agg caa cgc gag gtc ttc atg ccg agg
thr glu gly ile ser arg leu thr arg pro val arg gln arg glu val phe met pro arg
61/21                               91/31
acg tag aca gga aga gac agg gaa gct gat gac gtc gcg tac cgg acc gcc att ctg tcg
thr AMB thr gly arg asp arg glu ala asp asp val ala tyr arg thr ala ile leu ser
121/41                               151/51
agt ctt tcc gag ttc agc aac aat cga cac aga agc ggg gac cag acc ggg agg acg acg
ser leu ser glu phe ser asn asn arg his arg ser gly asp gln thr gly arg thr thr
181/61                               211/71
cgg ccc ggg ccg ctt cgg gcc gag tgt ctg agt aag acc aga gtc acg ggt ccg tgt gtg
arg pro gly pro leu arg ala glu cys leu ser lys thr arg val thr gly pro cys val
241/81                               271/91
aca acc gcg cgg aat tca atc gga tgg cgg gcg gga ccg gat tgc gcc ggt cac cga gga
thr thr ala arg asn ser ile gly trp arg ala gly pro asp cys ala gly his arg gly
301/101
acc tcc gga gtg atc
thr ser gly val ile

```

SEQ ID N° 12B

FIGURE 12B

37/185

1/1
 ccg aag gga ttt cgc gac taa ctc ggc ctg taa ggc aac gcg agg tct tca tgc cga gga
 pro lys gly phe arg asp OCH leu gly leu OCH gly asn ala arg ser ser cys arg gly
 61/21
 cgt aga cag gaa gag aca ggg aag ctg atg acg tcg cgt acc gga ccg cca ttc tgt cga
 arg arg gln glu glu thr gly lys leu met thr ser arg thr gly pro pro phe cys arg
 121/41
 gtc ttt ccg agt tca gca aca atc gac aca gaa gcg ggg acc aga ccg gga gga cga cgc
 val phe pro ser ser ala thr ile asp thr glu ala gly thr arg pro gly gly arg arg
 181/61
 ggc ccg ggc cgc ttc ggg ccg agt gtc tga gta aga cca gag tca cgg gtc cgt gtg tga
 gly pro gly arg phe gly pro ser val OPA val arg pro glu ser arg val arg val OPA
 241/81
 caa ccg cgc gga att caa tcg gat ggc ggg ccg gac cgg att gcg ccg gtc acc gag gaa
 gln pro arg gly ile gln ser asp gly gly arg asp arg ile ala pro val thr glu glu
 301/101
 cct ccg gag tga tc
 pro pro glu OPA

SEQ ID N° 12C

FIGURE 12C

1/1
 GGG ATT TCG TTG CCC GAT GGA TTG TTT GTA CGG TTT GGG AAA AAC ACT TGA AGT CCT TTT
 gly ile ser leu pro asp gly leu phe val arg phe gly lys asn thr OPA ser pro phe
 61/21
 TAT TGG CAA TGC TGG AAA TGG ACA TTC CAA TAT TGC GCG AAT TAA CCG AAC ACG GTG AGG
 tyr trp gln cys trp lys trp thr phe gln tyr cys ala asn OCH pro asn thr val arg
 121/41
 GGG GGG CAA GCG TTT GTA CCG GGG CCA GCA AGC GCC GCC GAC CGG TTG ACC GAA GCC AGC
 gly gly gln ala phe val pro gly pro ala ser ala ala asp arg leu thr glu ala ser
 181/61
 ATG TTG TTG TGT CAG CGC GGG CTT GGT CTC GAT GTC CCG GCC TTG GCT GGA CCC GCT TCT
 met leu leu cys gln arg gly leu gly leu asp val pro ala leu ala gly pro ala ser
 241/81
 TCA AAA CAG GTT GAA CTT AAC GAC TCA AGA ACG GAA ACG CTT GAA CCG CGA CGT CGC TCC
 ser lys gln val glu leu asn asp ser arg thr glu thr leu glu pro arg arg arg ser
 301/101
 GGA CAC CAA TTT GAC TCG GCT CTT TGG CAA TTG AAG GTG AGC TGC GAG CAG CCG GGT GAC
 gly his gln phe asp ser ala leu trp gln leu lys val ser cys glu gln pro gly asp
 361/121
 CGC ATC GTT GGC CTT GCC ATC AAT CGC CGG CTC GCG GAC GTA GAT AAT CAG CTC ACC GTT
 arg ile val gly leu ala ile asn arg arg leu ala asp val asp asn gln leu thr val
 421/141
 GGG ACC GAC CTC GAC CAG GGG TCC TTT GTG ACT GCC GGG CTT GAC GCG GAC GAC CAC AGA
 gly thr asp leu asp gln gly ser phe val thr ala gly leu asp ala asp asp his arg
 481/161
 GTC GGT CAT CGC CTA AGG CTA CCG TTC TGA CCT GGG GCT GCG TGG GCG CCG ACG ACG TGA
 val gly his arg leu arg leu pro phe OPA pro gly ala ala trp ala pro thr thr OPA
 541/181
 GGC ACG TCA TGT CTC AGC GGC CCA CCG CCA CCT CGG TCG CCG GCA GTA TGT CAG CAT GTG
 gly thr ser cys leu ser gly pro pro pro pro arg ser pro ala val cys gln his val
 601/201
 CAG ATG ACT CCA CGC AGC CTT GTT CGC ATC GTT GGT GTC GTG GTT GCG ACG ACC TTG GCG
 gln met thr pro arg ser leu val arg ile val gly val val val ala thr thr leu ala
 661/221
 CTG GTG AGC GCA CCC GCC GGC GGT CGT GCC GCG CAT GCG GAT C
 leu val ser ala pro ala gly gly arg ala ala his ala asp

SEQ ID N° 13A

FIGURE 13A
 FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

38/185

32/11

GGA TTT CGT TGC CCG ATG GAT TGT TTG TAC GGT TTG GGA AAA ACA CTT GAA GTC CTT TTT
 gly phe arg cys pro met asp cys leu tyr gly leu gly lys thr leu glu val leu phe
 62/21 92/31
 ATT GGC AAT GCT GGA AAT GGA CAT TCC AAT ATT GCG CGA ATT AAC CGA ACA CGG TGA GGG
 ile gly asn ala gly asn gly his ser asn ile ala arg ile asn arg thr arg OPA gly
 122/41 152/51
 GGG GGC AAG CGT TTG TAC CGG GGC CAG CAA GCG CCG CCG ACC GGT TGA CCG AAG CCA GCA
 gly gly lys arg leu tyr arg gly gln gln ala pro pro thr gly OPA pro lys pro ala
 182/61 212/71
 TGT TGT TGT GTC AGC GCG GGC TTG GTC TCG ATG TCC CGG CCT TGG CTG GAC CCG CTT CTT
 cys cys cys val ser ala gly leu val ser met ser arg pro trp leu asp pro leu leu
 242/81 272/91
 CAA AAC AGG TTG AAC TTA ACG ACT CAA GAA CGG AAA CGC TTG AAC CGC GAC GTC GCT CCG
 gln asn arg leu asn leu thr thr gln glu arg lys arg leu asn arg asp val ala pro
 302/101 332/111
 GAC ACC AAT TTG ACT CGG CTC TTT GGC AAT TGA AGG TGA GCT GCG AGC AGC CGG GTG ACC
 asp thr asn leu thr arg leu phe gly asn OPA arg OPA ala ala ser ser arg val thr
 362/121 392/131
 GCA TCG TTG GCC TTG CCA TCA ATC GCC GGC TCG CGG ACG TAG ATA ATC AGC TCA CCG TTG
 ala ser leu ala leu pro ser ile ala gly ser arg thr AMB ile ile ser ser pro leu
 422/141 452/151
 GGA CCG ACC TCG ACC AGG GGT CCT TTG TGA CTG CCG GGC TTG ACG CGG ACG ACC ACA GAG
 gly pro thr ser thr arg gly pro leu OPA leu pro gly leu thr arg thr thr thr glu
 482/161 512/171
 TCG GTC ATC GCC TAA GGC TAC CGT TCT GAC CTG GGG CTG CGT GGG CGC CGA CGA CGT GAG
 ser val ile ala OCH gly tyr arg ser asp leu gly leu arg gly arg arg arg glu
 542/181 572/191
 GCA CGT CAT GTC TCA GCG GCC CAC CGC CAC CTC GGT CGC CGG CAG TAT GTC AGC ATG TGC
 ala arg his val ser ala ala his arg his leu gly arg arg gln tyr val ser met cys
 602/201 632/211
 AGA TGA CTC CAC GCA GCC TTG TTC GCA TCG TTG GTG TCG TGG TTG CGA CGA CCT TGG CGC
 arg OPA leu his ala ala leu phe ala ser leu val ser trp leu arg arg pro trp arg
 662/221 692/231
 TGG TGA GCG CAC CCG CCG GCG GTC GTG CCG CGC ATG CGG ATC
 trp OPA ala his pro pro ala val val pro arg met arg ile

SEQ ID N° 13B

FIGURE 13B

39/185

33/11
 GAT TTC GTT GCC CGA TGG ATT GTT TGT ACG GTT TGG GAA AAA CAC TTG AAG TCC TTT TTA
 asp phe val ala arg trp ile val cys thr val trp glu lys his leu lys ser phe leu
 63/21 93/31
 TTG GCA ATG CTG GAA ATG GAC ATT CCA ATA TTG CGC GAA TTA ACC GAA CAC GGT GAG GGG
 leu ala met leu glu met asp ile pro ile leu arg glu leu thr glu his gly glu gly
 123/41 153/51
 GGG GCA AGC GTT TGT ACC GGG GCC AGC AAG CGC CGC CGA CCG GTT GAC CGA AGC CAG CAT
 gly ala ser val cys thr gly ala ser lys arg arg arg pro val asp arg ser gln his
 183/61 213/71
 GTT GTT GTG TCA GCG CGG GCT TGG TCT CGA TGT CCC GGC CTT GGC TGG ACC CGC TTC TTC
 val val val ser ala arg ala trp ser arg cys pro gly leu gly trp thr arg phe phe
 243/81 273/91
 AAA ACA GGT TGA ACT TAA CGA CTC AAG AAC GGA AAC GCT TGA ACC GCG ACG TCG CTC CGG
 lys thr gly OPA thr OCH arg leu lys asn gly asn ala OPA thr ala thr ser leu arg
 303/101 333/111
 ACA CCA ATT TGA CTC GGC TCT TTG GCA ATT GAA GGT GAG CTG CGA GCA GCC GGG TGA CCG
 thr pro ile OPA leu gly ser leu ala ile glu gly glu leu arg ala ala gly OPA pro
 363/121 393/131
 CAT CGT TGG CCT TGC CAT CAA TCG CCG GCT CGC GGA CGT AGA TAA TCA GCT CAC CGT TGG
 his arg trp pro cys his gln ser pro ala arg gly arg arg OCH ser ala his arg trp
 423/141 453/151
 GAC CGA CCT CGA CCA GGG GTC CTT TGT GAC TGC CGG GCT TGA CGC GGA CGA CCA CAG AGT
 asp arg pro arg pro gly val leu cys asp cys arg ala OPA arg gly arg pro gln ser
 483/161 513/171
 CGG TCA TCG CCT AAG GCT ACC GTT CTG ACC TGG GGC TGC GTG GGC GCC GAC GAC GTG AGG
 arg ser ser pro lys ala thr val leu thr trp gly cys val gly ala asp asp val arg
 543/181 573/191
 CAC GTC ATG TCT CAG CGG CCC ACC GCC ACC TCG GTC GCC GGC AGT ATG TCA GCA TGT GCA
 his val met ser gln arg pro thr ala thr ser val ala gly ser met ser ala cys ala
 603/201 633/211
 GAT GAC TCC ACG CAG CCT TGT TCG CAT CGT TGG TGT CGT GGT TGC GAC GAC CTT GGC GCT
 asp asp ser thr gln pro cys ser his arg trp cys arg gly cys asp asp leu gly ala
 663/221 693/231
 GGT GAG CGC ACC CGC CGG CGG TCG TGC CGC GCA TGC GGA TC
 gly glu arg thr arg arg arg ser cys arg ala cys gly

SEQ ID N° 13C

FIGURE 13C

40/185

partie de la séquence nucléotidique de seq13A

1/1 31/11
 GGG TCC TTT GTG ACT GCC GGG CTT GAC GCG GAC GAC CAC AGA GTC GGT CAT CGC CTA AGG
 gly ser phe val thr ala gly leu asp ala asp asp his arg val gly his arg leu arg
 61/21 91/31
 CTA CCG TTC TGA CCT GGG GCT GCG TGG GCG CCG ACG ACG TGA GGC ACG TCA TGT CTC AGC
 leu pro phe OPA pro gly ala ala trp ala pro thr thr OPA gly thr ser cys leu ser
 121/41 151/51
 GGC CCA CCG CCA CCT CGG TCG CCG GCA GTA TGT CAG CAT GTG CAG ATG ACT CCA CGC AGC
 gly pro pro pro pro arg ser pro ala val cys gln his val gln met thr pro arg ser
 181/61 211/71
 CTT GTT CGC ATC GTT GGT GTC GTG GTT GCG ACG ACC TTG GCG CTG GTG AGC GCA CCC GCC
 leu val arg ile val gly val val val ala thr thr leu ala leu val ser ala pro ala
 241/81
 GGC GGT CGT GCC GCG CAT GCG GAT C
 gly gly arg ala ala his ala asp

SEQ ID N° 13A'

FIGURE 13A'

1/1 31/11
 GGT CCT TTG TGA CTG CCG GGC TTG ACG CGG ACG ACC ACA GAG TCG GTC ATC GCC TAA GGC
 gly pro leu OPA leu pro gly leu thr arg thr thr thr glu ser val ile ala OCH gly
 61/21 91/31
 TAC CGT TCT GAC CTG GGG CTG CGT GGG GCG CGA CGA CGT GAG GCA CGT CAT GTC TCA CCG
 tyr arg ser asp leu gly leu arg gly arg arg arg arg glu ala arg his val ser ala
 121/41 151/51
 GCC CAC CGC CAC CTC GGT CGC CGG CAG TAT GTC AGC ATG TGC AGA TGA CTC CAC GCA GCC
 ala his arg his leu gly arg arg gln tyr val ser met cys arg OPA leu his ala ala
 181/61 211/71
 TTG TTC GCA TCG TTG GTG TCG TGG TTG CGA CGA CCT TGG CGC TGG TGA GCG CAC CCG CCG
 leu phe ala ser leu val ser trp leu arg arg pro trp arg trp OPA ala his pro pro
 241/81
 GCG GTC GTG CCG CGC ATG CGG ATC
 ala val val pro arg met arg ile

SEQ ID N° 13B'

FIGURE 13B'

1/1 31/11
 GTC CTT TGT GAC TGC CGG GCT TGA CGC GGA CGA CCA CAG AGT CGG TCA TCG CCT AAG GCT
 val leu cys asp cys arg ala OPA arg gly arg pro gln ser arg ser ser pro lys ala
 61/21 91/31
 ACC GTT CTG ACC TGG GGC TGC GTG GCG GCC GAC GAC GTG AGG CAC GTC ATG TCT CAG CGG
 thr val leu thr trp gly cys val gly ala asp asp val arg his val met ser gln arg
 121/41 151/51
 CCC ACC GCC ACC TCG GTC GCC GGC AGT ATG TCA GCA TGT GCA GAT GAC TCC ACG CAG CCT
 pro thr ala thr ser val ala gly ser met ser ala cys ala asp asp ser thr gln pro
 181/61 211/71
 TGT TCG CAT CGT TGG TGT CGT GGT TGC GAC GAC CTT GGC GCT GGT GAG CGC ACC CGC CGG
 cys ser his arg trp cys arg gly cys asp asp leu gly ala gly glu arg thr arg arg
 241/81
 CGG TCG TGC CGC GCA TGC GGA TC
 arg ser cys arg ala cys gly

SEQ ID N° 13C'

FIGURE 13C'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

41/185

séquence Rv1984c prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq13A'

```

1/1                               31/11
atg act cca cgc agc ctt gtt cgc atc gtt ggt gtc gtg gtt gcg acg acc ttg gcg ctg
Met thr pro arg ser leu val arg ile val gly val val val ala thr thr leu ala leu
61/21                               91/31
gtg agc gca ccc gcc ggc ggt cgt gcc gcg cat gcg gat ccg tgt tcg gac atc gcg gtc
val ser ala pro ala gly gly arg ala ala his ala asp pro cys ser asp ile ala val
121/41                               151/51
gtt ttc gct cgc ggc acg cat cag gct tct ggt ctt ggc gac gtc ggt gag gcg ttc gtc
val phe ala arg gly thr his gln ala ser gly leu gly asp val gly glu ala phe val
181/61                               211/71
gac tcg ctt acc tcg caa gtt ggc ggg cgg tcg att ggg gtc tac gcg gtg aac tac cca
asp ser leu thr ser gln val gly gly arg ser ile gly val tyr ala val asn tyr pro
241/81                               271/91
gca agc gac gac tac cgc gcg agc gcg tca aac ggt tcc gat gat gcg agc gcc cac atc
ala ser asp asp tyr arg ala ser ala ser asn gly ser asp asp ala ser ala his ile
301/101                               331/111
cag cgc acc gtc gcc agc tgc ccg aac acc agg att gtg ctt ggt ggc tat tcg cag ggt
gln arg thr val ala ser cys pro asn thr arg ile val leu gly gly tyr ser gln gly
361/121                               391/131
gcg acg gtc atc gat ttg tcc acc tcg gcg atg ccg ccc gcg gtg gca gat cat gtc gcc
ala thr val ile asp leu ser thr ser ala met pro pro ala val ala asp his val ala
421/141                               451/151
gct gtc gcc ctt ttc ggc gag cca tcc agt ggt ttc tcc agc atg ttg tgg ggc ggc ggg
ala val ala leu phe gly glu pro ser ser gly phe ser ser met leu trp gly gly gly
481/161                               511/171
tcg ttg ccg aca atc ggt ccg ctg tat agc tct aag acc ata aac ttg tgt gct ccc gac
ser leu pro thr ile gly pro leu tyr ser ser lys thr ile asn leu cys ala pro asp
541/181                               571/191
gat cca ata tgc acc gga ggc ggc aat att atg gcg cat gtt tcg tat gtt cag tcg ggg
asp pro ile cys thr gly gly gly asn ile met ala his val ser tyr val gln ser gly
601/201                               631/211
atg aca agc cag gcg gcg aca ttc gcg gcg aac agg ctc gat cac gcc gga tga
met thr ser gln ala ala thr phe ala ala asn arg leu asp his ala gly OPA

```

SEQ ID N° 13D

FIGURE 13D

42/185

Seq13F: ORF prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant Rv1984c

```

1/1                               31/11
tga ggc acg tca tgt ctc agc ggc cca ccg cca cct cgg tcg ccg gca gta tgt cag cat
OPA gly thr ser cys leu ser gly pro pro pro pro arg ser pro ala val cys gln his
61/21                               91/31
gtg cag atg act cca cgc agc ctt gtt cgc atc gtt ggt gtc gtg gtt gcg acg acc ttg
val gln met thr pro arg ser leu val arg ile val gly val val val ala thr thr leu
121/41                               151/51
gcg ctg gtg agc gca ccc gcc ggc ggt cgt gcc gcg cat gcg gat ccg tgt tcg gac atc
ala leu val ser ala pro ala gly gly arg ala ala his ala asp pro cys ser asp ile
181/61                               211/71
gcg gtc gtt ttc gct cgc ggc acg cat cag gct tct ggt ctt ggc gac gtc ggt gag gcg
ala val val phe ala arg gly thr his gln ala ser gly leu gly asp val gly glu ala
241/81                               271/91
ttc gtc gac tcg ctt acc tcg caa gtt ggc ggg ccg tcg att ggg gtc tac gcg gtg aac
phe val asp ser leu thr ser gln val gly gly arg ser ile gly val tyr ala val asn
301/101                               331/111
tac cca gca agc gac gac tac cgc gcg agc gcg tca aac ggt tcc gat gat gcg agc gcc
tyr pro ala ser asp asp tyr arg ala ser ala ser asn gly ser asp asp ala ser ala
361/121                               391/131
cac atc cag cgc acc gtc gcc agc tgc ccg aac acc agg att gtg ctt ggt ggc tat tcg
his ile gln arg thr val ala ser cys pro asn thr arg ile val leu gly gly tyr ser
421/141                               451/151
cag ggt gcg acg gtc atc gat ttg tcc acc tcg gcg atg ccg ccc gcg gtg gca gat cat
gln gly ala thr val ile asp leu ser thr ser ala met pro pro ala val ala asp his
481/161                               511/171
gtc gcc gct gtc gcc ctt ttc ggc gag cca tcc agt ggt ttc tcc agc atg ttg tgg gcc
val ala ala val ala leu phe gly glu pro ser ser gly phe ser ser met leu trp gly
541/181                               571/191
ggc ggg tcg ttg ccg aca atc ggt ccg ctg tat agc tct aag acc ata aac ttg tgt gct
gly gly ser leu pro thr ile gly pro leu tyr ser ser lys thr ile asn leu cys ala
601/201                               631/211
ccc gac gat cca ata tgc acc gga ggc gcc aat att atg gcg cat gtt tcg tat gtt cag
pro asp asp pro ile cys thr gly gly gly asn ile met ala his val ser tyr val gln
661/221                               691/231
tcg ggg atg aca agc cag gcg gcg aca ttc gcg gcg aac agg ctc gat cac gcc gga tga
ser gly met thr ser gln ala ala thr phe ala ala asn arg leu asp his ala gly OPA

```

SEQ ID N° 13F

FIGURE 13F

43/185

31/11
 CCA CCG GGG CTG GAG GGG CGA ATG TGC GCC GAA CGC CGT CGG CCA ACT TGG CCG CTG AGG
 pro pro gly leu glu gly arg met cys ala glu arg arg arg pro thr trp pro leu arg
 61/21
 GCG GCT GAT CCC CTG GCC CGA GAC GGG GCA AGC CAA TAG CGG CTC CAT CGG GCT TTG CTG
 ala ala asp pro leu ala arg asp gly ala ser gln AMB arg leu his arg ala leu leu
 121/41
 GTA GCG GTT CGG CGG GAA CCG AGC GCC GAC GTT GTC GGT GCC CGG TGA TAT ATT GGG TCA
 val ala val arg arg glu pro ser ala asp val val gly ala arg OPA tyr ile gly ser
 181/61
 GAC GGG TAT GGC GGC GAC TGA GGT GAT CTG CGA CAC GCC GCC GCG GTG CTC GAG CCA GGC
 asp gly tyr gly gly asp OPA gly asp leu arg his ala ala ala val leu glu pro gly
 241/81
 TTA CGA CCA GGG AAT TTC GAA AAT GTT ATT CAG AAC ATC TTG TAT CTC TTC CTC CGT GCC
 leu arg pro gly asn phe glu asn val ile gln asn ile leu tyr leu phe leu arg ala
 301/101
 ACC CCC TAG GTG TAG TGT TTT CGA GTA CCG GCA GAT CCC AGT TCA CCA GTC TCA CCA GAT
 thr pro AMB val AMB cys phe arg val pro ala asp pro ser ser pro val ser pro asp

C

SEQ ID N° 14A

FIGURE 14A

32/11
 CAC CGG GGC TGG AGG GGC GAA TGT GCG CCG AAC GCC GTC GGC CAA CTT GGC CGC TGA GGG
 his arg gly trp arg gly glu cys ala pro asn ala val gly gln leu gly arg OPA gly
 62/21
 CGG CTG ATC CCC TGG CCC GAG ACG GGG CAA GCC AAT AGC GGC TCC ATC GGG CTT TGC TGG
 arg leu ile pro trp pro glu thr gly gln ala asn ser gly ser ile gly leu cys trp
 122/41
 TAG CGG TTC GGC GGG AAC CGA GCG CCG ACG TTG TCG GTG CCC GGT GAT ATA TTG GGT CAG
 AMB arg phe gly gly asn arg ala pro thr leu ser val pro gly asp ile leu gly gln
 182/61
 ACG GGT ATG GCG GCG ACT GAG GTG ATC TGC GAC ACG CCG CCG CGG TGC TCG AGC CAG GCT
 thr gly met ala ala thr glu val ile cys asp thr pro pro arg cys ser ser gln ala
 242/81
 TAC GAC CAG GGA ATT TCG AAA ATG TTA TTC AGA ACA TCT TGT ATC TCT TCC TCC GTG CCA
 tyr asp gln gly ile ser lys met leu phe arg thr ser cys ile ser ser ser val pro
 302/101
 CCC CCT AGG TGT AGT GTT TTC GAG TAC CGG CAG ATC CCA GTT CAC CAG TCT CAC CAG ATC
 pro pro arg cys ser val phe glu tyr arg gln ile pro val his gln ser his gln ile

SEQ ID N° 14B

FIGURE 14B

44/185

33/11
 ACC GGG GCT GGA GGG GCG AAT GTG CGC CGA ACG CCG TCG GCC AAC TTG GCC GCT GAG GGC
 thr gly ala gly gly ala asn val arg arg thr pro ser ala asn leu ala ala glu gly
 63/21
 93/31
 GGC TGA TCC CCT GGC CCG AGA CGG GGC AAG CCA ATA GCG GCT CCA TCG GGC TTT GCT GGT
 gly OPA ser pro gly pro arg arg gly lys pro ile ala ala pro ser gly phe ala gly
 123/41
 153/51
 AGC GGT TCG GCG GGA ACC GAG CGC CGA CGT TGT CGG TGC CCG GTG ATA TAT TGG GTC AGA
 ser gly ser ala gly thr glu arg arg arg cys arg cys pro val ile tyr trp val arg
 183/61
 213/71
 CGG GTA TGG CGG CGA CTG AGG TGA TCT GCG ACA CGC CGC CGC GGT GCT CGA GCC AGG CTT
 arg val trp arg arg leu arg OPA ser ala thr arg arg arg gly ala arg ala arg leu
 243/81
 273/91
 ACG ACC AGG GAA TTT CGA AAA TGT TAT TCA GAA CAT CTT GTA TCT CTT CCT CCG TGC CAC
 thr thr arg glu phe arg lys cys tyr ser glu his leu val ser leu pro pro cys his
 303/101
 333/111
 CCC CTA GGT GTA GTG TTT TCG AGT ACC GGC AGA TCC CAG TTC ACC AGT CTC ACC AGA TC
 pro leu gly val val phe ser ser thr gly arg ser gln phe thr ser leu thr arg

SEQ ID N° 14C

FIGURE 14C

partie de la séquence nucléotidique de seq14A

1/1 31/11
 TTT TCG AGT ACC GGC AGA TCC CAG GTT CAC CAG GTC TCA CCA GAT C
 phe ser ser thr gly arg ser gln val his gln val ser pro asp

SEQ ID N° 14A'

FIGURE 14A'

1/1 31/11
 TGT TTT CGA GTA CCG GCA GAT CCC AGG TTC ACC AGG TCT CAC CAG ATC
 cys phe arg val pro ala asp pro arg phe thr arg ser his gln ile

SEQ ID N° 14C

FIGURE 14C

1/1 31/11
 GTT TTC GAG TAC CGG CAG ATC CCA GGT TCA CCA GGT CTC ACC AGA TC
 val phe glu tyr arg gln ile pro gly ser pro gly leu thr arg

SEQ ID N° 14C'

FIGURE 14C'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

45/185

ORF prédite d'après la séquence publiée par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq14A'

1/1	31/11
TAG CGG TTC GGC GGG AAG CTA GCG GCG ACG	TTG TCG GTG GCC GGT GAT ATA TTG GGT CAG
AMB arg phe gly gly lys leu ala ala thr	leu ser val ala gly asp ile leu gly gln
61/21	91/31
ACG GGT ATG GCG GCG GCT GAG GTG ATC TGC	GAC ACG CCG CCG CGG TGC TCG AGC CAG GCT
thr gly met ala ala ala glu val ile cys	asp thr pro pro arg cys ser ser gln ala
121/41	151/51
TAC GAC CAG GGA ATT TCG AAA ATG TTA TTC	AGA ACA TCT TGT ATC TCT TCT CCG TGC CAC
tyr asp gln gly ile ser lys met leu phe	arg thr ser cys ile ser ser pro cys his
181/61	211/71
CCC CTA GGT GTA GTG TTT TCG AGT ACC GGC	AGA TCC CAG GTT CAC CAG GTC TCA CCA gat
pro leu gly val val phe ser ser thr gly	arg ser gln val his gln val ser pro asp
241/81	271/91
cca cgg ggc gcg atg aac ttc ccg gca tcg	gca tcg cca ggt cga cgg acg tgg tcg cgc
pro arg gly ala met asn phe pro ala ser	ala ser pro gly arg arg thr trp ser arg
301/101	331/111
tat gac ggg aat ctg gag cct tgt cgg gcc	gct caa cat atc gaa gat gca cta ctt gag
tyr asp gly asn leu glu pro cys arg ala	ala gln his ile glu asp ala leu leu glu
361/121	391/131
tcg ttg cca gat cct gtc aga ttc ccg att	tcc gca aag gag cgg tac gcc cat gac cgt
ser leu pro asp pro val arg phe pro ile	ser ala lys glu arg tyr ala his asp arg
421/141	
gac cgt tta cac taa	
asp arg leu his OCH	

SEQ ID N° 14F

FIGURE 14F

46/185

Séquence Rv3054c prédite par Cole et l. (Nature 393:537-544)
pouvant être en phase avec Seq14A'

1/1	31/11
gtg tca gat acc aag tcc gac atc aaa atc	ttg gcc tta gtg gga agc ctg cgc gcg gcg
val ser asp thr lys ser asp ile lys ile	leu ala leu val gly ser leu arg ala ala
61/21	91/31
tcg ttc aac cgc cag atc gcc gag ctg gct	gcc aag gtc gct ccg gac ggc gtc acc gtc
ser phe asn arg gln ile ala glu leu ala	ala lys val ala pro asp gly val thr val
121/41	151/51
acc atg ttc gag ggg ctg ggg gac ctg ccg	ttc tac aac gaa gac atc gac aca gcg acg
thr met phe glu gly leu gly asp leu pro	phe tyr asn glu asp ile asp thr ala thr
181/61	211/71
gag gtg ccg gcg ccg gtg agc gcg ttg cgg	gag gcc gcg tct gac gcg cac gct gcc ttg
glu val pro ala pro val ser ala leu arg	glu ala ala ser asp ala his ala ala leu
241/81	271/91
gtg gtc acg ccg gaa tac aac ggc agc att	ccg gcc gtg atc aag aac gcg atc gac tgg
val val thr pro glu tyr asn gly ser ile	pro ala val ile lys asn ala ile asp trp
301/101	331/111
ctg tcc agg cca ttc ggc gat ggc gcg ttg	aag gac aag ccg ttg gcc gtg atc ggc ggc
leu ser arg pro phe gly asp gly ala leu	lys asp lys pro leu ala val ile gly gly
361/121	391/131
tcc atg ggc cgc tac ggc ggg gta tgg gcg	cac gac gag act cgc aag tcg ttc agc atc
ser met gly arg tyr gly gly val trp ala	his asp glu thr arg lys ser phe ser ile
421/141	451/151
gct ggc acg cgg gtg gtc gat gcg atc aaa	ctg tcg gtg ccg ttc caa act ctg ggc aag
ala gly thr arg val val asp ala ile lys	leu ser val pro phe gln thr leu gly lys
481/161	511/171
tcg gtc gcg gac gac gcc ggg ctg gcg gcg	aat gtg cgc gac gcc gtc ggc aac ttg gcc
ser val ala asp asp ala gly leu ala ala	asn val arg asp ala val gly asn leu ala
541/181	
gct gag gtc ggc tga	
ala glu val gly OPA	

SEQ ID N° 14R

FIGURE 14R

47/185

ORF prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant RV3054c

```

1/1                                31/11
taa cgc gat cgg aat aaa tcg gac cat ggt ccg gtt ggc tcg tgc aag gac gtg gac caa
OCH arg asp arg asn lys ser asp his gly pro val gly ser cys lys asp val asp gln
61/21                                91/31
caa gcg gaa agg aac gta gca gtg tca gat acc aag tcc gac atc aaa atc ttg gcc tta
gln ala glu arg asn val ala val ser asp thr lys ser asp ile lys ile leu ala leu
121/41                               151/51
gtg gga agc ctg cgc gcg gcg tcg ttc aac cgc cag atc gcc gag ctg gct gcc aag gtc
val gly ser leu arg ala ala ser phe asn arg gln ile ala glu leu ala ala lys val
181/61                               211/71
gct ccg gac ggc gtc acc gtc acc atg ttc gag ggg ctg ggg gac ctg ccg ttc tac aac
ala pro asp gly val thr val thr met phe glu gly leu gly asp leu pro phe tyr asn
241/81                               271/91
gaa gac atc gac aca gcg acg gag gtg ccg gcg ccg gtg agc gcg ttg cgg gag gcc gcg
glu asp ile asp thr ala thr glu val pro ala pro val ser ala leu arg glu ala ala
301/101                              331/111
tct gac gcg cac gct gcc ttg gtg gtc acg ccg gaa tac aac ggc agc att ccg gcc gtg
ser asp ala his ala ala leu val val thr pro glu tyr asn gly ser ile pro ala val
361/121                              391/131
atc aag aac gcg atc gac tgg ctg tcc agg cca ttc ggc gat ggc gcg ttg aag gac aag
ile lys asn ala ile asp trp leu ser arg pro phe gly asp gly ala leu lys asp lys
421/141                              451/151
ccg ttg gcc gtg atc ggc ggc tcc atg ggc cgc tac ggc ggg gta tgg gcg cac gac gag
pro leu ala val ile gly gly ser met gly arg tyr gly gly val trp ala his asp glu
481/161                              511/171
act cgc aag tcg ttc agc atc gct ggc acg cgg gtg gtc gat gcg atc aaa ctg tcg gtg
thr arg lys ser phe ser ile ala gly thr arg val val asp ala ile lys leu ser val
541/181                              571/191
ccg ttc caa act ctg ggc aag tcg gtc gcg gac gac gcc ggg ctg gcg gcg aat gtg cgc
pro phe gln thr leu gly lys ser val ala asp asp ala gly leu ala ala asn val arg
601/201                              631/211
gac gcc gtc ggc aac ttg gcc gct gag gtc ggc tga
asp ala val gly asn leu ala ala glu val gly OPA

```

SEQ ID N° 14P

FIGURE 14P

48/185

fragment d'après la séquence publiée par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq 14F' et seq 14P'

1/1

31/11

taa cgc gat cgg aat aaa tcg gac cat ggt ccg gtt ggc tcg tgc aag gac gtg gac caa
 OCH arg asp arg asn lys ser asp his gly pro val gly ser cys lys asp val asp gln
 asn ala ile gly ile asn arg thr met val arg leu ala arg ala arg thr trp thr asn
 thr arg ser glu OCH ile gly pro trp ser gly trp leu val gln gly arg gly pro thr
 61/21 91/31

caa gcg gaa agg aac gta gca gtg tca gat acc aag tcc gac atc aaa atc ttg gcc tta
 gln ala glu arg asn val ala val ser asp thr lys ser asp ile lys ile leu ala leu
 lys arg lys gly thr AMB gln cys gln ile pro ser pro thr ser lys ser trp pro AMB
 ser gly lys glu arg ser ser val arg tyr gln val arg his gln asn leu gly leu ser
 121/41 151/51

gtg gga agc ctg cgc gcg gcg tcg ttc aac cgc cag atc gcc gag ctg gct gcc aag gtc
 val gly ser leu arg ala ala ser phe asn arg gln ile ala glu leu ala ala lys val
 trp glu ala cys ala arg arg arg ser thr ala arg ser pro ser trp leu pro arg ser
 gly lys pro ala arg gly val val gln pro pro asp arg arg ala gly cys gln gly arg
 181/61 211/71

gct ccg gac ggc gtc acc gtc acc atg ttc gag ggg ctg ggg gac ctg ccg ttc tac aac
 ala pro asp gly val thr val thr met phe glu gly leu gly asp leu pro phe tyr asn
 leu arg thr ala ser pro cys ser arg gly trp gly thr cys arg ser thr thr
 ser gly arg arg his arg his his val arg gly ala gly gly pro ala val leu gln arg
 241/81 271/91

gaa gac atc gac aca gcg acg gag gtg ccg gcg ccg gtg agc gcg ttg ccg gag gcc gcg
 glu asp ile asp thr ala thr glu val pro ala pro val ser ala leu arg glu ala ala
 lys thr ser thr gln arg arg arg cys arg arg arg OPA ala arg cys gly arg pro arg
 arg his arg his ser asp gly gly ala gly ala gly glu arg val ala gly gly arg val
 301/101 331/111

tct gac gcg cac gct gcc ttg gtg gtc acg ccg gaa tac aac ggc agc att ccg gcc gtg
 ser asp ala his ala ala leu val val thr pro glu tyr asn gly ser ile pro ala val
 leu thr arg thr leu pro trp trp ser arg arg asn thr thr ala ala phe arg pro OPA
 OPA arg ala arg cys leu gly gly his ala gly ile gln arg gln his ser gly arg asp
 361/121 391/131

atc aag aac gcg atc gac tgg ctg tcc agc cca ttc ggc gat ggc gcg ttg aag gac aag
 ile lys asn ala ile asp trp leu ser arg pro phe gly asp gly ala leu lys asp lys
 ser arg thr arg ser thr gly cys pro gly his ser ala met ala arg OPA arg thr ser
 gln glu arg asp arg leu ala val gln ala ile arg arg trp arg val glu gly gln ala
 421/141 451/151

ccg ttg gcc gtg atc ggc ggc tcc atg ggc cgc tac ggc ggg gta tgg gcg cac gac gag
 pro leu ala val ile gly gly ser met gly arg tyr gly gly val trp ala his asp glu
 arg trp pro OPA ser ala ala pro trp ala ala thr ala gly tyr gly arg thr thr arg
 val gly arg asp arg arg leu his gly pro leu arg arg gly met gly ala arg arg asp
 481/161 511/171

act cgc aag tcg ttc agc atc gct ggc acg ccg gtg gtc gat gcg atc aaa ctg tcg gtg
 thr arg lys ser phe ser ile ala gly thr arg val val asp ala ile lys leu ser val
 leu ala ser arg ser ala ser leu ala arg gly trp ser met arg ser asn cys arg cys
 ser gln val val gln his arg trp his ala gly gly arg cys asp gln thr val gly ala
 541/181 571/191

ccg ttc caa act ctg ggc aag tcg gtc gcg gac gac gcc ggg ctg gcg gcg aat gtg cgc
 pro phe gln thr leu gly lys ser val ala asp asp ala gly leu ala ala asn val arg
 arg ser lys leu trp ala ser arg ser arg thr thr pro gly trp arg arg met cys ala
 val pro asn ser gly gln val gly arg gly arg arg ala gly gly glu cys ala arg
 601/201 631/211

gac gcc gtc ggc aac ttg gcc gct gag gtc ggc tga tcc ctg ggc cga ggc ggg tca gcc
 asp ala val gly asn leu ala ala glu val gly OPA ser leu gly arg gly gly ser ala
 thr pro ser ala thr trp pro leu arg ser ala asp pro trp ala glu ala gly gln pro
 arg arg arg gln leu gly arg OPA gly arg leu ile pro gly pro arg arg val ser gln
 661/221 691/231

aat agc ggc tcc atc ggc ttt gct ggt agc ggt tcg gcg gga agc tag ccg cga cgt tgt
 asn ser gly ser ile gly phe ala gly ser gly ser ala gly ser AMB arg arg arg cys
 ile ala ala pro ser ala leu leu val ala val arg arg glu ala ser gly asp val val
 AMB arg leu his arg leu cys trp AMB arg phe gly gly lys leu ala ala thr leu ser

SEQ ID N° 14Q

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

49/185

721/241

cgg tgg ccg gtg ata tat tgg gtc aga cgg gta tgg cgg cgg ctg agg tga tct gcg aca
arg trp pro val ile tyr trp val arg arg val trp arg arg leu arg OPA ser ala thr
gly gly arg OPA tyr ile gly ser asp gly tyr gly gly gly OPA gly asp leu arg his
val ala gly asp ile leu gly gln thr gly met ala ala ala glu val ile cys asp thr

781/261

811/271

cgc cgc cgc ggt gct cga gcc agg ctt acg acc agg gaa ttt cga aaa tgt tat tca gaa
arg arg arg gly ala arg ala arg leu thr thr arg glu phe arg lys cys tyr ser glu
ala ala ala val leu glu pro gly leu arg pro gly asn phe glu asn val ile gln asn
pro pro arg cys ser ser gln ala tyr asp gln gly ile ser lys met leu phe arg thr

841/281

871/291

cat ctt gta tct ctt ctc cgt gcc acc ccc tag gtg tag tgt ttt cga gta ccg gca gat
his leu val ser leu leu arg ala thr pro AMB val AMB cys phe arg val pro ala asp
ile leu tyr leu phe ser val pro pro pro arg cys ser val phe glu tyr arg gln ile
ser cys ile ser ser pro cys his pro leu gly val val phe ser ser thr gly arg ser

901/301

931/311

ccc agg ttc acc agg tct cac cag atc cac ggg gcg cga tga act tcc cgg cat cgg cat
pro arg phe thr arg ser his gln ile his gly ala arg OPA thr ser arg his arg his
pro gly ser pro gly leu thr arg ser thr gly arg asp glu leu pro gly ile gly ile
gln val his gln val ser pro asp pro arg gly ala met asn phe pro ala ser ala ser

961/321

991/331

cgc cag gtc gac gga cgt ggt cgc gct atg acg gga atc tgg agc ctt gtc ggg ccg ctc
arg gln val asp gly arg gly arg ala met thr gly ile trp ser leu val gly pro leu
ala arg ser thr asp val val ala leu OPA arg glu ser gly ala leu ser gly arg ser
pro gly arg arg thr trp ser arg tyr asp gly asn leu glu pro cys arg ala ala gln

1021/341

1051/351

aac ata tcg aag atg cac tac ttg agt cgt tgc cag atc ctg tca gat tcc cga ttt ccg
asn ile ser lys met his tyr leu ser arg cys gln ile leu ser asp ser arg phe pro
thr tyr arg arg cys thr thr OPA val val ala arg ser cys gln ile pro asp phe arg
his ile glu asp ala leu leu glu ser leu pro asp pro val arg phe pro ile ser ala

1081/361

1111/371

caa agg agc ggt acg ccc atg acc gtg acc gtt tac act aa
gln arg ser gly thr pro met thr val thr val tyr thr
lys gly ala val arg pro OPA pro OPA pro phe thr leu
lys glu arg tyr ala his asp arg asp arg leu his OCH

SEQ ID N° 14Q(suite)

FIGURE 14Q(suite)

1/1

31/11

CAA GCC CGG CCG CGA CTG TTT GCC GTT TTG GGG CTC CTA CCA GAA CAC CAC CTG GCG GCC
gln ala arg pro arg leu phe ala val leu gly leu leu pro glu his his leu ala ala

61/21

91/31

GCG CAC CAT GGT GTG CAC CAG TTG CGA TCG GTT CCT CCC GCG CGC GGG CGG CGA CGA CGT
ala his his gly val his gln leu arg ser val pro pro ala arg gly arg arg arg arg

121/41

151/51

CGA TGC CCG CGC CCC GGC GGC GCA GCT GCG TAG CTC GAC CCG GTC GAC GAC GAC GGG GTC
arg cys pro arg pro gly gly ala ala ala AMB leu asp pro val asp asp asp gly val

181/61

211/71

GGC GGA CCA GTC GGG GAT GTC GAG GCG ATG GCA ATA CAG CGC CTT GGT GCG CGG CCA CAC
gly gly pro val gly asp val glu ala met ala ile gln arg leu gly ala arg pro his

241/81

271/91

GTC TGA GGT GGC GAA GAC CAG TCC CGC GCC CAC CGG CAG CCG GAT CCG GAT ACG CGG TAC
val OPA gly gly glu asp gln ser arg ala his arg gln pro asp pro asp thr arg tyr

SEQ ID N° 15A

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

50/185

32/11
 AAG CCC GGC CGC GAC TGT TTG CCG TTT TGG GGC TCC TAC CAG AAC ACC ACC TGG CGG CGG
 lys pro gly arg asp cys leu pro phe trp gly ser tyr gln asn thr thr trp arg pro
 62/21
 CGC ACC ATG GTG TGC ACC AGT TGC GAT CGG TTC CTC CCG CGC GCG GGC GGC GAC GAC GTC
 arg thr met val cys thr ser cys asp arg phe leu pro arg ala gly gly asp asp val
 122/41
 GAT GCC CGC GCC CCG GCG GCG CAG CTG CGT AGC TCG ACC CGG TCG ACG ACG ACG GGG TCG
 asp ala arg ala pro ala ala gln leu arg ser ser thr arg ser thr thr thr gly ser
 182/61
 GCG GAC CAG TCG GCG ATG TCG AGG CGA TGG CAA TAC AGC GCC TTG GTG CGC GGC CAC ACG
 ala asp gln ser ala met ser arg arg trp gln tyr ser ala leu val arg gly his thr
 242/81
 TCT GAG GTG GCG AAG ACC AGT CCC GCG CCC ACC GGC AGC CGG ATC CGG ATA CGC GGT AC
 ser glu val ala lys thr ser pro ala pro thr gly ser arg ile arg ile arg gly

SEQ ID N° 15B

FIGURE 15B

33/11
 AGC CCG GCC GCG ACT GTT TGC CGT TTT GGG GCT CCT ACC AGA ACA CCA CCT GGC GGC CGC
 ser pro ala ala thr val cys arg phe gly ala pro thr arg thr pro pro gly gly arg
 63/21
 GCA CCA TGG TGT GCA CCA GTT GCG ATC GGT TCC TCC CGC GCG CGG GCG GCG ACG ACG TCG
 ala pro trp cys ala pro val ala ile gly ser ser arg ala arg ala ala thr thr ser
 123/41
 ATG CCC GCG CCC CGG CGG CGC AGC TGC GTA GCT CGA CCC GGT CGA CGA CGA CGG GGT CGG
 met pro ala pro arg arg arg ser cys val ala arg pro gly arg arg arg gly arg
 183/61
 CGG ACC AGT CGG CGA TGT CGA GGC GAT GGC AAT ACA GCG CCT TGG TGC GCG GCC ACA CGT
 arg thr ser arg arg cys arg gly asp gly asn thr ala pro trp cys ala ala thr arg
 243/81
 CTG AGG TGG CGA AGA CCA GTC CCG CGC CCA CCG GCA GCC GGA TCC GGA TAC GCG GTA C
 leu arg trp arg arg pro val pro arg pro pro ala ala gly ser gly tyr ala val

SEQ ID N° 15C

FIGURE 15C

51/185

partie de la séquence nucléotidique de seq15A

```

1/1                               31/11
GGC GGC CGC GCG CCA TGG TGT GCA CCA GTT GCG ATC GGT TCT CCC GCG CGC GGG CGG CGA
gly gly arg ala pro trp cys ala pro val ala ile gly ser pro ala arg gly arg arg
61/21                               91/31
CGA CGT CGA TGG CCG CGC CCC GGC GGC TGC AGC TGC GTA GCT CGA CCC GGT CGA CGA CGA
arg arg arg trp pro arg pro gly gly cys ser cys val ala arg pro gly arg arg arg
121/41                             151/51
CGG GGT CGG CGG GCC AGT CGG CGA TGT CGA GGC GAT GGC AAT ACA GCG CCT TGG TGC GCG
arg gly arg arg ala ser arg arg cys arg gly asp gly asn thr ala pro trp cys ala
181/61                             211/71
GCC ACA CGT CTG AGG TGG CGA AGA CCA GTC CCG CGC CCA CCG GCA GCC GGA TC
ala thr arg leu arg trp arg arg pro val pro arg pro pro ala ala gly

```

SEQ ID N° 15A'

FIGURE 15A'

```

1/1                               31/11
GCG GCC GCG CGC CAT GGT GTG CAC CAG TTG CGA TCG GTT CTC CCG CGC GCG GGC GGC GAC
ala ala ala arg his gly val his gln leu arg ser val leu pro arg ala gly gly asp
61/21                               91/31
GAC GTC GAT GGC CGC GCC CCG GCG GCT GCA GCT GCG TAG CTC GAC CCG GTC GAC GAC GAC
asp val asp gly arg ala pro ala ala ala ala ala AMB leu asp pro val asp asp asp
121/41                             151/51
GGG GTC GGC GGG CCA GTC GGC GAT GTC GAG GCG ATG GCA ATA CAG CGC CTT GGT GCG CGG
gly val gly gly pro val gly asp val glu ala met ala ile gln arg leu gly ala arg
181/61                             211/71
CCA CAC GTC TGA GGT GGC GAA GAC CAG TCC CGC GCC CAC CGG CAG CCG GAT C
pro his val OPA gly gly glu asp gln ser arg ala his arg gln pro asp

```

SEQ ID N° 15B'

FIGURE 15B'

```

1/1                               31/11
TGG CGG CCG CGC GCC ATG GTG TGC ACC AGT TGC GAT CGG TTC TCC CGC GCG CGG GCG GCG
trp arg pro arg ala met val cys thr ser cys asp arg phe ser arg ala arg ala ala
61/21                               91/31
ACG ACG TCG ATG GCC GCG CCC CGG CGG CTG CAG CTG CGT AGC TCG ACC CGG TCG ACG ACG
thr thr ser met ala ala pro arg arg leu gln leu arg ser ser thr arg ser thr thr
121/41                             151/51
ACG GGG TCG GCG GGC CAG TCG GCG ATG TCG AGG CGA TGG CAA TAC AGC GCC TTG GTG GCG
thr gly ser ala gly gln ser ala met ser arg arg trp gln tyr ser ala leu val arg
181/61                             211/71
GGC CAC ACG TCT GAG GTG GCG AAG ACC AGT CCC GCG CCC ACC GGC AGC CGG ATC
gly his thr ser glu val ala lys thr ser pro ala pro thr gly ser arg ile

```

SEQ ID N° 15C'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

52/185

ORF contenant Seq15A' d'après Cole et al. (Nature 393:537-544)

1/1	31/11
taa ggt ccg cca acg ctt tac gct cga cgg	ccg cca cga gtt ggc cgg cca ctt tca ggc
OCH gly pro pro thr leu tyr ala arg arg	pro pro arg val gly arg pro leu ser gly
61/21	91/31
cgt agt cgc cgc agg gca ggg ctt ccc gcg	tgc tct tgc cgg gtt tgt cgg caa agg tgt
arg ser arg arg arg ala gly leu pro ala	ser ser ser arg val cys arg gln arg cys
121/41	151/51
agg ggt agc gtt cgt ggg cgt cga cga cga	tgt gca gct cgg gga tgc cgg cgg cgc ggg
arg gly ser val arg gly arg arg arg arg	cys ala ala arg gly cys arg arg arg gly
181/61	211/71
cgg tgg ggg tgc gca cgc ccg gcc gcg act	ggt tgc gcg ttt tgg ggc tct gcc aga aca
arg trp gly cys ala arg pro ala ala thr	val cys ala phe trp gly ser ala arg thr
241/81	271/91
cca cct ggc ggc cgc gcg cca tgg tgt gca	cca gtt gcg atc ggt tct ccc gcg cgc ggg
pro pro gly gly arg ala pro trp cys ala	pro val ala ile gly ser pro ala arg gly
301/101	331/111
cgg cga cga cgt cga tgg ccg cgc ccc ggc	ggc tgc agc tgc gta gct cga ccc ggt cga
arg arg arg arg arg trp pro arg pro gly	gly cys ser cys val ala arg pro gly arg
361/121	391/131
cga cga cgg ggt cgg cgg gcc agt cgg cga	tgt cga ggc gat ggc aat aca gcg cct tgg
arg arg arg gly arg arg ala ser arg arg	cys arg gly asp gly asn thr ala pro trp
421/141	451/151
tgc gcg gcc aca cgt ctg agg tgg cga aga	cca gtc ccg cgc cca ccg gca gcc gga tca
cys ala ala thr arg leu arg trp arg arg	pro val pro arg pro pro ala ala gly ser
481/161	511/171
ggg agg gca ggc gcg agt ctt cag cgg ggt	tgg cgg cga cga gca gct cca cag agt gtg
gly arg ala gly ala ser leu gln arg gly	trp arg arg arg ala ala pro gln ser val
541/181	571/191
agg gta cgg gcg gcg tac ggc aac ggt gaa	gca ggc act ccg acg aac cca tgc tca cgt
arg val arg ala ala tyr gly asn gly glu	ala gly thr pro thr asn pro ser ser arg
601/201	
cga agg ggc agg tga	
arg arg gly arg OPA	

SEQ ID N° 15F

FIGURE 15F

53/185

R:Rv2530c prédite d'après Cole et al. (Nature 393:537-544) et pouvant être en phase avec SEQ15A

```

1/1                               31/11
gtg acg gca ctg ctc gat gtc aat gtg ctg atc gcg ctg ggc tgg ccg aat cac gtt cac
val thr ala leu leu asp val asn val leu ile ala leu gly trp pro asn his val his
61/21                               91/31
cat gcg gcc gcg cag cga tgg ttc acg cag ttc tcc tcg aat ggg tgg gcc acc acg ccg
his ala ala ala gln arg trp phe thr gln phe ser ser asn gly trp ala thr thr pro
121/41                               151/51
atc acc gag gca ggg tat gtc cga att tca agc aat cgc agt gtg atg cag gtg tcg acc
ile thr glu ala gly tyr val arg ile ser ser asn arg ser val met gln val ser thr
181/61                               211/71
acg ccg gct atc gcg atc gct cag ttg gcg gcg atg act tct ctt gcc ggg cac acg ttt
thr pro ala ile ala ile ala gln leu ala ala met thr ser leu ala gly his thr phe
241/81                               271/91
tgg cct gac gat gtg cca ctg atc gtt ggg agc gcc ggc gat cgc gat gcg gtg tcc aac
trp pro asp asp val pro leu ile val gly ser ala gly asp arg asp ala val ser asn
301/101                               331/111
cac cgt cgg gtc acc gac tgc cat ctc atc gcc ttg gcc gcg cgc tac ggg gcc cgg ttg
his arg arg val thr asp cys his leu ile ala leu ala ala arg tyr gly gly arg leu
361/121                               391/131
gtc aca ttc gat gcc gca ctg gcc gat tca gca tcc gca gcc ctc gtc gag gtg ttg tag
val thr phe asp ala ala leu ala asp ser ala ser ala gly leu val glu val leu AMB

```

SEQ ID N° 15R

FIGURE 15R

Seq15P: ORF d'après Cole et al. (Nature 393:537-544) contenant Rv2530c

```

1/1                               31/11
tga tgt tcc gcc gga tgc gcc gac ggt gac ttc cga gga tgt cgt ccg cgc gct cga gga
OPA cys ser ala gly cys ala asp gly asp phe arg gly cys arg pro arg ala arg gly
61/21                               91/31
cga cgt gtg acg gca ctg ctc gat gtc aat gtg ctg atc gcg ctg ggc tgg ccg aat cac
arg arg val thr ala leu leu asp val asn val leu ile ala leu gly trp pro asn his
121/41                               151/51
gtt cac cat gcg gcc gcg cag cga tgg ttc acg cag ttc tcc tcg aat ggg tgg gcc acc
val his his ala ala ala gln arg trp phe thr gln phe ser ser asn gly trp ala thr
181/61                               211/71
acg ccg atc acc gag gca ggg tat gtc cga att tca agc aat cgc agt gtg atg cag gtg
thr pro ile thr glu ala gly tyr val arg ile ser ser asn arg ser val met gln val
241/81                               271/91
tcg acc acg ccg gct atc gcg atc gct cag ttg gcg gcg atg act tct ctt gcc ggg cac
ser thr thr pro ala ile ala ile ala gln leu ala ala met thr ser leu ala gly his
301/101                               331/111
acg ttt tgg cct gac gat gtg cca ctg atc gtt ggg agc gcc ggc gat cgc gat gcg gtg
thr phe trp pro asp asp val pro leu ile val gly ser ala gly asp arg asp ala val
361/121                               391/131
tcc aac cac cgt cgg gtc acc gac tgc cat ctc atc gcc ttg gcc gcg cgc tac ggg gcc
ser asn his arg arg val thr asp cys his leu ile ala leu ala ala arg tyr gly gly
421/141                               451/151
cgg ttg gtc aca ttc gat gcc gca ctg gcc gat tca gca tcc gca gcc ctc gtc gag gtg
arg leu val thr phe asp ala ala leu ala asp ser ala ser ala gly leu val glu val
481/161
ttg tag
leu AMB

```

SEQ ID N° 15P

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 15P

54/185

Fragment contenant Seq15P' et Seq 15F'

1/1 31/11
 tga tgt tcc gcc gga tgc gcc gac ggt gac ttc cga gga tgt cgt ccg cgc gct cga gga
 OPA cys ser ala gly cys ala asp gly asp phe arg gly cys arg pro arg ala arg gly
 asp val pro pro asp ala pro thr val thr ser glu asp val val arg ala leu glu asp
 Met phe arg arg met arg arg arg OPA leu pro arg met ser ser ala arg ser arg thr
 61/21 91/31
 cga cgt gtg acg gca ctg ctc gat gtc aat gtg ctg atc gcg ctg ggc tgg ccg aat cac
 arg arg val thr ala leu leu asp val asn val leu ile ala leu gly trp pro asn his
 asp val OPA arg his cys ser met ser met cys OPA ser arg trp ala gly arg ile thr
 thr cys asp gly thr ala arg cys gln cys ala asp arg ala gly leu ala glu ser arg
 121/41 151/51
 gtt cac cat gcg gcc gcg cag cga tgg ttc acg cag ttc tcc tcg aat ggg tgg gcc acc
 val his his ala ala ala gln arg trp phe thr gln phe ser ser asn gly trp ala thr
 phe thr met arg pro arg ser asp gly ser arg ser ser pro arg met gly gly pro pro
 ser pro cys gly arg ala ala met val his ala val leu leu glu trp val gly his his
 181/61 211/71
 acg ccg atc acc gag gca ggg tat gtc cga att tca agc aat cgc agt gtg atg cag gtg
 thr pro ile thr glu ala gly tyr val arg ile ser ser asn arg ser val met gln val
 arg arg ser pro arg gln gly met ser glu phe gln ala ile ala val OPA cys arg cys
 ala asp his arg gly arg val cys pro asn phe lys gln ser gln cys asp ala gly val
 241/81 271/91
 tcg acc acg ccg gct atc gcg atc gct cag ttg gcg gcg atg act tct ctt gcc ggg cac
 ser thr thr pro ala ile ala ile ala gln leu ala ala met thr ser leu ala gly his
 arg pro arg arg leu ser arg ser leu ser trp arg arg OPA leu leu leu pro gly thr
 asp his ala gly tyr arg asp arg ser val gly gly asp phe ser cys arg ala his
 301/101 331/111
 acg ttt tgg cct gac gat gtg cca ctg atc gtt ggg agc gcc ggc gat cgc gat gcg gtg
 thr phe trp pro asp asp val pro leu ile val gly ser ala gly asp arg asp ala val
 arg phe gly leu thr met cys his OPA ser leu gly ala pro ala ile ala met arg cys
 val leu ala OPA arg cys ala thr asp arg trp glu arg arg arg ser arg cys gly val
 361/121 391/131
 tcc aac cac cgt cgg gtc acc gac tgc cat ctc atc gcc ttg gcc gcg cgc tac ggg ggc
 ser asn his arg arg val thr asp cys his leu ile ala leu ala ala arg tyr gly gly
 pro thr thr val gly ser pro thr ala ile ser ser pro trp pro arg ala thr gly ala
 gln pro pro ser gly his arg leu pro ser his arg leu gly arg ala leu arg gly pro
 421/141 451/151
 cgg ttg gtc aca ttc gat gcc gca ctg gcc gat tca gca tcc gca ggc ctc gtc gag gtg
 arg leu val thr phe asp ala ala leu ala asp ser ala ser ala gly leu val glu val
 gly trp ser his ser met pro his trp pro ile gln his pro gln ala ser ser arg cys
 val gly his ile arg cys arg thr gly arg phe ser ile arg arg pro arg arg gly val
 481/161 511/171
 ttg tag tca ccg ggg atg ggc ggc tcg cca ggc ctg cag gat ctg cgg gcg cag gcg ccc
 leu AMB ser pro gly met gly gly ser pro gly leu gln asp leu arg ala gln ala pro
 cys ser his arg gly trp ala ala arg gln ala cys arg ile cys gly arg arg arg pro
 val val thr gly asp gly arg leu ala arg pro ala gly ser ala gly ala gly ala pro
 541/181 571/191
 ccg gtc gga cac cgg cag gcc gac gct ttt ggc cca cgc gcg cag ctc ggc gct gct ggg
 pro val gly his arg gln ala asp ala phe gly pro arg ala gln leu gly ala ala gly
 arg ser asp thr gly arg pro thr leu leu ala his ala arg ser ser ala leu leu gly
 gly arg thr pro ala gly arg arg phe trp pro thr arg ala ala arg arg cys trp ala
 601/201 631/211
 ctc ggg ctc ggc ggc agc cgg ctc gaa aac cgt ggt ggc gtc ggc atc gtc gac gaa cca
 leu gly leu gly gly ser arg leu glu asn arg gly gly val gly ile val asp glu pro
 ser gly ser ala ala ala gly ser lys thr val val ala ser ala ser ser thr asn gln
 arg ala arg arg gln pro ala arg lys pro trp trp arg arg his arg arg thr arg

SEQ ID N° 15Q

FIGURE 15Q

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

55/185

661/221 691/231
 ggt gag ggc ggc ggc tag ata gcg gta ggt gta ttc ctg ggc gag ctt gcg ggt ttg gca
 gly glu gly gly gly AMB ile ala val gly val phe leu gly glu leu ala gly leu ala
 val arg ala ala ala arg AMB arg AMB val tyr ser trp ala ser leu arg val trp gln
 OPA gly arg arg leu asp ser gly arg cys ile pro gly arg ala cys gly phe gly arg
 721/241 751/251
 gaa cac gat cgg cac gtt ggg aaa gcc gat ctg caa ttc ggc cag ccc atc ggc gat cgc
 glu his asp arg his val gly lys ala asp leu gln phe gly gln pro ile gly asp arg
 asn thr ile gly thr leu gly lys pro ile cys asn ser ala ser pro ser ala ile ala
 thr arg ser ala arg trp glu ser arg ser ala ile arg pro ala his arg arg ser pro
 781/261 811/271
 cgt cgg gcg ggc gaa gga gtg cgc gaa gat ctc cga gta gcg gtc ctc gac cac cac ggc
 arg arg ala gly glu gly val arg glu asp leu arg val ala val leu asp his his gly
 val gly arg ala lys glu cys ala lys ile ser glu AMB arg ser ser thr thr thr ala
 ser gly gly arg arg ser ala arg arg ser pro ser ser gly pro arg pro arg arg
 841/281 871/291
 ggc ccg tgg cag cgc ggc cag ttc ggt cag ttg gta ttt cag gtt gcc gtt cag cac gcc
 gly pro trp gln arg gly gln phe gly gln leu val phe gln val ala val gln his ala
 ala arg gly ser ala ala ser ser val ser trp tyr phe arg leu pro phe ser thr pro
 pro val ala ala arg pro val arg ser val gly ile ser gly cys arg ser ala arg gln
 901/301 931/311
 aga agt aag gtc cgc caa cgc ttt acg ctc gac ggc cgc cac gag ttg gcc ggc cac ttt
 arg ser lys val arg gln arg phe thr leu asp gly arg his glu leu ala gly his phe
 glu val arg ser ala asn ala leu arg ser thr ala ala thr ser trp pro ala thr phe
 lys OCH gly pro pro thr leu tyr ala arg arg pro pro arg val gly arg pro leu ser
 961/321 991/331
 cag gcc gta gtc gcc gca ggg cag gcc ttc ccg cgt cgt ctt cgc ggg ttt gtc gcc aaa
 gln ala val val ala ala gly gln gly phe pro arg arg leu arg gly phe val gly lys
 arg pro AMB ser pro gln gly arg ala ser arg val val phe ala gly leu ser ala lys
 gly arg ser arg arg arg ala gly leu pro ala ser ser ser arg val cys arg gln arg
 1021/341 1051/351
 ggt gta ggg gta gcg ttc gtg gcc gtc gac gat gtg cag ctc ggg gat gcc gcc ggc
 gly val gly val ala phe val gly val asp asp asp val gln leu gly asp ala gly gly
 val AMB gly AMB arg ser trp ala ser thr thr met cys ser ser gly met pro ala ala
 cys arg gly ser val arg gly arg arg arg arg cys ala ala arg gly cys arg arg arg
 1081/361 1111/371
 gcg gcc ggt ggg ggt gcg cac gcc ccg ccg cga ctg ttt gcg cgt ttt ggg gct ctg cca
 ala gly gly gly gly ala his ala arg pro arg leu phe ala arg phe gly ala leu pro
 arg ala val gly val arg thr pro gly arg asp cys leu arg val leu gly leu cys gln
 gly arg trp gly cys ala arg pro ala ala thr val cys ala phe trp gly ser ala arg
 1141/381 1171/391
 gaa cac cac ctg gcg gcc gcg cgc cat ggt gtg cac cag ttg cga tcg gtt ctc ccg cgc
 glu his his leu ala ala ala arg his gly val his gln leu arg ser val leu pro arg
 asn thr thr trp arg pro arg ala met val cys thr ser cys asp arg phe ser arg ala
 thr pro pro gly gly arg ala pro trp cys ala pro val ala ile gly ser pro ala arg
 1201/401 1231/411
 gcg gcc ggc gac gac gtc gat gcc cgc gcc ccg gcg gct gca gct gcg tag ctc gac ccg
 ala gly gly asp asp val asp gly arg ala pro ala ala ala ala AMB leu asp pro
 arg ala ala thr thr ser met ala ala pro arg arg leu gln leu arg ser ser thr arg
 gly arg arg arg arg arg trp pro arg pro gly gly cys ser cys val ala arg pro gly
 1261/421 1291/431
 gtc gac gac gac ggg gtc gcc ggg cca gtc gcc gat gtc gag gcg atg gca ata cag cgc
 val asp asp asp gly val gly gly pro val gly asp val glu ala met ala ile gln arg
 ser thr thr thr gly ser ala gly gln ser ala met ser arg arg trp gln tyr ser ala
 arg arg arg arg gly arg arg ala ser arg arg cys arg gly asp gly asn thr ala pro

SEQ ID N° 15Q (suite 1)

FIGURE 15Q (suite 1)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

56/185

1321/441
 ctt ggt gcg cgg cca cac gtc tga ggt ggc gaa gac cag tcc cgc gcc cac cgg cag ccg
 leu gly ala arg pro his val OPA gly gly glu asp gln ser arg ala his arg gln pro
 leu val arg gly his thr ser glu val ala lys thr ser pro ala pro thr gly ser arg
 trp cys ala ala thr arg leu arg trp arg arg pro val pro arg pro pro ala ala gly
 1381/461
 gat cag gta ggg cag gcg cga gtc ttc agc ggg gtt ggc gcc gag cag ctc cac aga
 asp gln val gly gln ala arg val phe ser gly val gly gly asp glu gln leu his arg
 ile arg AMB gly arg arg glu ser ser ala gly leu ala ala thr ser ser ser thr glu
 ser gly arg ala gly ala ser leu gln arg gly trp arg arg ala ala pro gln ser
 1441/481
 gtg tga ggg tac ggg cgg cgt acg gca acg gtg aag cag gca ctc cga cga acc cat cgt
 val OPA gly tyr gly arg arg thr ala thr val lys gln ala leu arg arg thr his arg
 cys glu gly thr gly gly val arg gln arg OPA ser arg his ser asp glu pro ile val
 val arg val arg ala ala tyr gly asn gly glu ala gly thr pro thr asn pro ser ser
 1501/501
 cac gtc gaa ggg gca ggt ga
 his val glu gly ala gly
 thr ser lys gly gln val
 arg arg arg gly arg OPA

SEQ ID N° 15Q (suite 2)

FIGURE 15Q (suite (2))

31/11
 TGC GCA TGC CGA CCA GTG TGG TTG GCC GGA GTT CGT TTG TTC GCG ATT GCC TCA ACG ATT
 cys ala cys arg pro val trp leu ala gly val arg leu phe ala ile ala ser thr ile
 61/21
 CGA TAT AAC CAC TCT AGT CAC ATC AAC CAC ACT CGT ACC ATC GAG CGT GTG GGT TCA TGC
 arg tyr asn his ser ser his ile asn his thr arg thr ile glu arg val gly ser cys
 121/41
 CAT GCA TTC GCG ACC GCG GGA GCC GGC GAA CCC GGC GCC ACA CAT AAT CCA GAT TGA GGA
 his ala phe ala thr ala gly ala gly glu pro gly ala thr his asn pro asp OPA gly
 181/61
 GAC TTC CGT GCC GAA CCG ACG CCG ACG CAA GCT TTC GAC AGC CAT GAG CGC GGT CGC CGC
 asp phe arg ala glu pro thr pro thr gln ala phe asp ser his glu arg gly arg arg
 241/81
 CCT GGC AGT TGC AAG TCC TTG TGC ATA TTT TCT TGT CTA CGA ATC AAC CGA AAC GAC CGA
 pro gly ser cys lys ser leu cys ile phe ser cys leu arg ile asn arg asn asp arg
 301/101
 GCG GCC CGA GCA CCA TGA ATT CAA GCA GGC GGC GGT GTT GAC CGA CCT GCC CGG CGA GCT
 ala ala arg ala pro OPA ile gln ala gly gly gly val asp arg pro ala arg arg ala
 361/121
 GAT GTC CGC GCT ATC GCA GGG GTT GTC CCA GTT CGG GAT C
 asp val arg ala ile ala gly val val pro val arg asp

SEQ ID N° 16A

FIGURE 16A

57/185

32/11

GCG CAT GCC GAC CAG TGT GGT TGG CCG GAG TTC GTT TGT TCG CGA TTG CCT CAA CGA TTC
 ala his ala asp gln cys gly trp pro glu phe val cys ser arg leu pro gln arg phe
 62/21 92/31

GAT ATA ACC ACT CTA GTC ACA TCA ACC ACA CTC GTA CCA TCG AGC GTG TGG GTT CAT GCC
 asp ile thr thr leu val thr ser thr thr leu val pro ser ser val trp val his ala
 122/41 152/51

ATG CAT TCG CGA CCG CGG GAG CCG GCG AAC CCG GCG CCA CAC ATA ATC CAG ATT GAG GAG
 met his ser arg pro arg glu pro ala asn pro ala pro his ile ile gln ile glu glu
 182/61 212/71

ACT TCC GTG CCG AAC CGA CGC CGA CGC AAG CTT TCG ACA GCC ATG AGC GCG GTC GCC GCC
 thr ser val pro asn arg arg arg arg lys leu ser thr ala met ser ala val ala ala
 242/81 272/91

CTG GCA GTT GGA AGT CCT TGT GCA TAT TTT CTT GTC TAC GAA TCA ACC GAA ACG ACC GAG
 leu ala val ala ser pro cys ala tyr phe leu val tyr glu ser thr glu thr thr glu
 302/101 332/111

CGG CCC GAG CAC CAT GAA TTC AAG CAG GCG GCG GTG TTG ACC GAC CTG CCC GGC GAG CTG
 arg pro glu his his glu phe lys gln ala ala val leu thr asp leu pro gly glu leu
 362/121 392/131

ATG TCC GCG CTA TCG CAG GGG TTG TCC CAG TCC GGG ATC
 met ser ala leu ser gln gly leu ser gln phe gly ile

SEQ ID N° 16B

FIGURE 16B

33/11

CGC ATG CCG ACC AGT GTG GTT GGC CCG AGT TCG TTT GTT CGC GAT TGC CTC AAC GAT TCG
 arg met pro thr ser val val gly arg ser ser phe val arg asp cys leu asn asp ser
 63/21 93/31

ATA TAA CCA CTC TAG TCA CAT CAA CCA CAC TCG TAC CAT CGA GCG TGT GGG TTC ATG CCA
 ile OCH pro leu AMB ser his gln pro his ser tyr his arg ala cys gly phe met pro
 123/41 153/51

TGC ATT CGC GAC CGC GGG AGC CGG CGA ACC CGG CGC CAC ACA TAA TCC AGA TTG AGG AGA
 cys ile arg asp arg gly ser arg arg thr arg arg his thr OCH ser arg leu arg arg
 183/61 213/71

CTT CCG TGC CGA ACC GAC GCC GAC GCA AGC TTT CGA CAG CCA TGA GCG CGG TCG CCG CCC
 leu pro cys arg thr asp ala asp ala ser phe arg gln pro OPA ala arg ser pro pro
 243/81 273/91

TGG CAG TTG CAA GTC CTT GTG CAT ATT TTC TTG TCT ACG AAT CAA CCG AAA CGA CCG AGC
 trp gln leu gln val leu val his ile phe leu ser thr asn gln pro lys arg pro ser
 303/101 333/111

GGC CCG AGC ACC ATG AAT TCA AGC AGG CGG CGG TGT TGA CCG ACC TGC CCG GCG AGC TGA
 gly pro ser thr met asn ser ser arg arg arg cys OPA pro thr cys pro ala ser OPA
 363/121 393/131

TGT CCG CGC TAT CGC AGG GGT TGT CCC AGT TCG GGA TC
 cys pro arg tyr arg arg gly cys pro ser ser gly

SEQ ID N° 16C

FIGURE 16C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

58/185

31/11

GCG GGC CAC CGA TCA GTC GAT CGG GTG GTT TCC GCT CCA TCA GCC CGG AAT TGA GGT GCC
 ala gly his arg ser val asp arg val val ser ala pro ser ala arg asn OPA gly ala
 61/21
 GCA GTG ACG ACA CCA GCG CAG GAC GCG CCG TTG GTG TTT CCC TCT GTT GCT TTC CCG TCC
 ala val thr thr pro ala gln asp ala pro leu val phe pro ser val ala phe pro ser
 121/41
 GGC TCG CCT TTT TTT CAT CAA CGT TGG ACT GCC GCA GTG GCG ATG TTG GTC GCC GGC GTG
 gly ser pro phe phe his gln arg trp thr ala ala val ala met leu val ala gly val
 181/61
 TTC GGT CAC CTG ACG GTC GGG ATG TTC CTT GGG TCT CGG GTT GCT GCT GGG TTT GCT CAA
 phe gly his leu thr val gly met phe leu gly ser arg val ala ala gly phe ala gln
 241/81
 TGC CCT GCT GGT GCG GCG TTC GGC CGA GTC GAT CAC CGC CAA AGA GCA CCC GTT AAA ACG
 cys pro ala gly ala ala phe gly arg val asp his arg gln arg ala pro val lys thr
 301/101
 GTC GAT GGC CCT CAA CTC GGC ATC GCG ACT GGC GAT TAT CAC CAT GCC TCG GGC TGA TC
 val asp gly pro gln leu gly ile ala thr gly asp tyr his his ala ser gly OPA

SEQ ID N° 17A

FIGURE 17A

32/11

CGG GCC ACC GAT CAG TCG ATC GGG TGG TTT CCG CTC CAT CAG CCC GGA ATT GAG GTG CCG
 arg ala thr asp gln ser ile gly trp phe pro leu his gln pro gly ile glu val pro
 62/21
 CAG TGA CGA CAC CAG CGC AGG ACG CGC CGT TGG TGT TTC CCT CTG TTG CTT TCC CGT CCG
 gln OPA arg his gln arg arg thr arg arg trp cys phe pro leu leu leu ser arg pro
 122/41
 GCT CGC CTT TTT TTC ATC AAC GTT GGA CTG CCG CAG TGG CGA TGT TGG TCG CCG GCG TGT
 ala arg leu phe phe ile asn val gly leu pro gln trp arg cys trp ser pro ala cys
 182/61
 TCG GTC ACC TGA CGG TCG GGA TGT TCC TTG GGT CTC GGG TTG CTG CTG GGT TTG CTC AAT
 ser val thr OPA arg ser gly cys ser leu gly leu gly leu leu leu gly leu leu asn
 242/81
 GCC CTG CTG GTG CGG CGT TCG GCC GAG TCG ATC ACC GCC AAA GAG CAC CCG TTA AAA CCG
 ala leu leu val arg arg ser ala glu ser ile thr ala lys glu his pro leu lys arg
 302/101
 TCG ATG GCC CTC AAC TCG GCA TCG CGA CTG GCG ATT ATC ACC ATG CCT CCG GCT GAT C
 ser met ala leu asn ser ala ser arg leu ala ile ile thr met pro arg ala asp

SEQ ID N° 17B

FIGURE 17B

59/185

33/11
 GGG CCA CCG ATC AGT CGA TCG GGT GGT TTC CGC TCC ATC AGC CCG GAA TTG AGG TGC CGC
 gly pro pro ile ser arg ser gly gly phe arg ser ile ser pro glu leu arg cys arg
 63/21
 AGT GAC GAC ACC AGC GCA GGA CGC GCC GTT GGT GTT TCC CTC TGT TGC TTT CCC GTC CGG
 ser asp asp thr ser ala gly arg ala val gly val ser leu cys cys phe pro val arg
 123/41
 CTC GCC TTT TTT TCA TCA ACG TTG GAC TGC CGC AGT GGC GAT GTT GGT CGC CGG CGT GTT
 leu ala phe phe ser ser thr leu asp cys arg ser gly asp val gly arg arg arg val
 183/61
 CGG TCA CCT GAC GGT CGG GAT GTT CCT TGG GTC TCG GGT TGC TGC TGG GTT TGC TCA ATG
 arg ser pro asp gly arg asp val pro trp val ser gly cys cys trp val cys ser met
 243/81
 CCC TGC TGG TGC GGC GTT CGG CCG AGT CGA TCA CCG CCA AAG AGC ACC CGT TAA AAC GGT
 pro cys trp cys gly val arg pro ser arg ser pro pro lys ser thr arg OCH asn gly
 303/101
 CGA TGG CCC TCA ACT CGG CAT CGC GAC TGG CGA TTA TCA CCA TGC CTC GGG CTG ATC
 arg trp pro ser thr arg his arg asp trp arg leu ser pro cys leu gly leu ile

SEQ ID N° 17C

FIGURE 17C

partie de la séquence nucléotidique de seq17A

1/1 31/11
 ggc tag aac ccc gaa gga gac ctc gcg ggt tgc cgg ccc ccg gcc cat cgg atg cgt atc
 gly AMB asn pro glu gly asp leu ala gly cys arg pro pro ala his arg met arg ile
 61/21
 cgg tcg cgc cga ttc acg acc gac ata ggg agc tac ccc ttg ggt gat tcc ggt gcg acg
 arg ser arg arg phe thr thr asp ile gly ser tyr pro leu gly asp ser gly ala thr
 121/41
 act gcg ata cgc tcg gcg ggc cac cga tca gtc gat cgg gtg gtt tcc gct cca tca gcc
 thr ala ile arg ser ala gly his arg ser val asp arg val val ser ala pro ser ala
 181/61
 cgg aat tga ggt gcc gca gtg acg aca cca gcg cag gac gcg ccg ttg gtg ttt ccc tct
 arg asn OPA gly ala ala val thr thr pro ala gln asp ala pro leu val phe pro ser
 241/81
 gtt gct ttc cgt ccg gtt cgc ctt ttt ttc atc aac gtt gga ctg gcc gca gtg gcg atg
 val ala phe arg pro val arg leu phe phe ile asn val gly leu ala ala val ala met
 301/101
 ttg gtc gcc gcc gtg ttc ggt cac ctg acg gtc ggg atg ttc ttg ggt ctc ggg ttg ctg
 leu val ala gly val phe gly his leu thr val gly met phe leu gly leu gly leu leu
 361/121
 ctg ggt ttg ctc aat gcc ctg ctg gtg cgg cgt tcg gcc gag tcg atc acc gcc aaa gag
 leu gly leu leu asn ala leu leu val arg arg ser ala glu ser ile thr ala lys glu
 421/141
 cac ccg tta aaa ccg tcg atg gcc ctc aac tcg gca tcg cga ctg gcg att atc acc atc
 his pro leu lys arg ser met ala leu asn ser ala ser arg leu ala ile ile thr ile
 481/161
 ctc ggg ctg atc
 leu gly leu ile

SEQ ID N° 17A'

FIGURE 17A'
 FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

60/185

```

1/1                               31/11
gct aga acc ccg aag gag acc tcg cgg gtt gcc gcc ccc cgg ccc atc gga tgc gta tcc
ala arg thr pro lys glu thr ser arg val ala gly pro arg pro ile gly cys val ser
61/21                               91/31
ggt cgc gcc gat tca cga ccg aca tag gga gct acc cct tgg gtg att ccg gtg cga cga
gly arg ala asp ser arg pro thr AMB gly ala thr pro trp val ile pro val arg arg
121/41                               151/51
ctg cga tac gct cgg cgg gcc acc gat cag tcg atc ggg tgg ttt ccg ctc cat cag ccc
leu arg tyr ala arg arg ala thr asp gln ser ile gly trp phe pro leu his gln pro
181/61                               211/71
gga att gag gtg ccg cag tga cga cac cag cgc agg acg cgc cgt tgg tgt ttc cct ctg
gly ile glu val pro gln OPA arg his gln arg arg thr arg arg trp cys phe pro leu
241/81                               271/91
ttg ctt tcc gtc cgg ttc gcc ttt ttt tca tca acg ttg gac tgg ccg cag tgg cga tgt
leu leu ser val arg phe ala phe phe ser ser thr leu asp trp pro gln trp arg cys
301/101                               331/111
tgg tcg ccg gcg tgt tcg gtc acc tga cgg tcg gga tgt tct tgg gtc tcg ggt tgc tgc
trp ser pro ala cys ser val thr OPA arg ser gly cys ser trp val ser gly cys cys
361/121                               391/131
tgg gtt tgc tca atg ccc tgc tgg tgc gcc gtt cgg ccg agt cga tca ccg cca aag agc
trp val cys ser met pro cys trp cys gly val arg pro ser arg ser pro pro lys ser
421/141                               451/151
acc cgt taa aac ggt cga tgg ccc tca act cgg cat cgc gac tgg cga tta tca cca tcc
thr arg OCH asn gly arg trp pro ser thr arg his arg asp trp arg leu ser pro ser
481/161
tcg gcc tga tc
ser gly OPA

```

SEQ ID N° 17B'

FIGURE 17B'

```

1/1                               31/11
cta gaa ccc cga agg aga cct cgc ggg ttg ccg gcc ccc gcc cca tcg gat gcg tat ccg
leu glu pro arg arg arg pro arg gly leu pro ala pro gly pro ser asp ala tyr pro
61/21                               91/31
gtc gcg ccg att cac gac cga cat agg gag cta ccc ctt ggg tga ttc cgg tgc gac gac
val ala pro ile his asp arg his arg glu leu pro leu gly OPA phe arg cys asp asp
121/41                               151/51
tgc gat acg ctc gcc ggg cca ccg atc agt cga tcg ggt ggt ttc cgc tcc atc agc ccg
cys asp thr leu gly gly pro pro ile ser arg ser gly gly phe arg ser ile ser pro
181/61                               211/71
gaa ttg agg tgc cgc agt gac gac acc agc gca gga cgc gcc gtt ggt gtt tcc ctc tgt
glu leu arg cys arg ser asp asp thr ser ala gly arg ala val gly val ser leu cys
241/81                               271/91
tgc ttt ccg tcc ggt tcg cct ttt ttt cat caa cgt tgg act gcc cgc agt gcc gat gtt
cys phe pro ser gly ser pro phe phe his gln arg trp thr gly arg ser gly asp val
301/101                               331/111
ggt cgc cgg cgt gtt cgg tca cct gac ggt cgg gat gtt ctt ggg tct cgg gtt gct gct
gly arg arg arg val arg ser pro asp gly arg asp val leu gly ser arg val ala ala
361/121                               391/131
ggg ttt gct caa tgc cct gct ggt gcg gcg ttc gcc cga gtc gat cac cgc caa aga gca
gly phe ala gln cys pro ala gly ala ala phe gly arg val asp his arg gln arg ala
421/141                               451/151
ccc gtt aaa acg gtc gat gcc cct caa ctc gcc atc gcg act gcc gat tat cac cat cct
pro val lys thr val asp gly pro gln leu gly ile ala thr gly asp tyr his his pro
481/161
cgg gct gat c
arg ala asp

```

SEQ ID N° 17C'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

61/185

séquence Rv1303 prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant partiellement Seq17A'

```

1/1
atg acg aca cca gcg cag gac gcg ccg ttg gtg ttt ccc tct gtt gct ttc cgt ccg gtt
met thr thr pro ala gln asp ala pro leu val phe pro ser val ala phe arg pro val
61/21
cgc ctt ttt ttc atc aac gtt gga ctg gcc gca gtg gcg atg ttg gtc gcc gcc gtg ttc
arg leu phe phe ile asn val gly leu ala ala val ala met leu val ala gly val phe
121/41
ggg cac ctg acg gtc ggg atg ttc ttg ggt ctc ggg ttg ctg ctg ggt ttg ctc aat gcc
gly his leu thr val gly met phe leu gly leu gly leu leu leu gly leu leu asn ala
181/61
ctg ctg gtg ccg cgt tcc gcc gag tcc atc acc gcc aaa gag cac ccg tta aaa ccg tcc
leu leu val arg arg ser ala glu ser ile thr ala lys glu his pro leu lys arg ser
241/81
atg gcc ctc aac tcc gca tcc cga ctg gcg att atc acc atc ctc ggg ctg atc atc gcc
met ala leu asn ser ala ser arg leu ala ile ile thr ile leu gly leu ile ile ala
301/101
tac att ttc ccg ccc gct gga ttg gcc gtc gtg ttc ggg ctg gca ttc ttc cag gtg ctg
tyr ile phe arg pro ala gly leu gly val val phe gly leu ala phe phe gln val leu
361/121
ctg gtg gca acg acg gcc ctg ccg gtc ctg aag aag ctg cgc act gcc acc gag gaa ccg
leu val ala thr thr ala leu pro val leu lys lys leu arg thr ala thr glu glu pro
421/141
gtc gca act tat tct tcc aat gcc cag acc ggg gga tcc gaa gga agg agc gcc agc gat
val ala thr tyr ser ser asn gly gln thr gly gly ser glu gly arg ser ala ser asp
481/161
gac tga
asp OPA

```

SEQ ID N° 17D

FIGURE 17D

Orf d'après Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant Rv1303

```

1/1
tga ggt gcc gca gtg acg aca cca gcg cag gac gcg ccg ttg gtg ttt ccc tct gtt gct
OPA gly ala ala val thr thr pro ala gln asp ala pro leu val phe pro ser val ala
61/21
ttc cgt ccg gtt ccg ctt ttt ttc atc aac gtt gga ctg gcc gca gtg gcg atg ttg gtc
phe arg pro val arg leu phe phe ile asn val gly leu ala ala val ala met leu val
121/41
gcc gcc gtg ttc ggt cac ctg acg gtc ggg atg ttc ttg ggt ctc ggg ttg ctg ctg ggt
ala gly val phe gly his leu thr val gly met phe leu gly leu gly leu leu leu gly
181/61
ttg ctc aat gcc ctg ctg gtg ccg cgt tcc gcc gag tcc atc acc gcc aaa gag cac ccg
leu leu asn ala leu leu val arg arg ser ala glu ser ile thr ala lys glu his pro
241/81
tta aaa ccg tcc atg gcc ctc aac tcc gca tcc cga ctg gcg att atc acc atc ctc ggg
leu lys arg ser met ala leu asn ser ala ser arg leu ala ile ile thr ile leu gly
301/101
ctg atc atc gcc tac att ttc ccg ccc gct gga ttg gcc gtc gtg ttc ggg ctg gca ttc
leu ile ile ala tyr ile phe arg pro ala gly leu gly val val phe gly leu ala phe
361/121
ttc cag gtg ctg ctg gtg gca acg acg gcc ctg ccg gtc ctg aag aag ctg cgc act gcc
phe gln val leu leu val ala thr thr ala leu pro val leu lys lys leu arg thr ala
421/141
acc gag gaa ccg gtc gca act tat tct tcc aat gcc cag acc ggg gga tcc gaa gga agg
thr glu glu pro val ala thr tyr ser ser asn gly gln thr gly gly ser glu gly arg
481/161
agc gcc agc gat gac tga
ser ala ser asp asp OPA

```

SEQ ID N° 17F

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

62/185

31/11
 GTC GAA CAG GTA CGG AAG GCG CCG TCG GTC GCT CGG TCC GCT GGT ATC TCG TGT TCA GCC
 val glu gln val arg lys ala pro ser val ala arg ser ala gly ile ser cys ser ala
 61/21
 AGC CAG CGG CCG TTA ACG TGG CCG AAC AGG TCG TCT TGG GGT CGG GCA TCA GCG TCG ATG
 ser gln arg pro leu thr trp pro asn arg ser ser trp gly arg ala ser ala ser met
 121/41
 TGG CTC AGG TCG ATA CCC GAG GGG ATG GCA AGT GTC ACC CCG CCA TCC TTC CAC CTC TTT
 trp leu arg ser ile pro glu gly met ala ser val thr pro pro ser phe his leu phe
 181/61
 TCG GGT GCA ACG ATC GGG CCA TGC CTG ACG GGG AGC AGA GCC AGC CAC CGG CCC AAG AAG
 ser gly ala thr ile gly pro cys leu thr gly ser arg ala ser his arg pro lys lys
 241/81
 ATG CGG AAG ACG ACT CGC GGC CCG ACG CCG CGG AGG CCG CCG CGG CCG AAC CCA AAT CAT
 met arg lys thr thr arg gly pro thr pro arg arg pro pro arg pro asn pro asn his
 301/101
 CAG CCG GTC CCG ATG TTC TCG ACC TAC GGT ATC GCC TCG ACA CTA CTC GGC GTG CTA TCG
 gln pro val pro met phe ser thr tyr gly ile ala ser thr leu leu gly val leu ser
 361/121
 GTC GCC GCG GTC GTG CTG GGT GCG ATG ATC
 val ala ala val val leu gly ala met ile

SEQ ID N° 18A

FIGURE 18A

32/11
 TCG AAC AGG TAC GGA AGG CGC CGT CCG TCG CTC GGT CCG CTG GTA TCT CGT GTT CAG CCA
 ser asn arg tyr gly arg arg arg arg ser leu gly pro leu val ser arg val gln pro
 62/21
 GCC AGC GGC CGT TAA CGT GGC CGA ACA GGT CGT CTT GGG GTC GGG CAT CAG CGT CGA TGT
 ala ser gly arg OCH arg gly arg thr gly arg leu gly val gly his gln arg arg cys
 122/41
 GGC TCA GGT CGA TAC CCG AGG GGA TGG CAA GTG TCA CCC CGC CAT CCT TCC ACC TCT TTT
 gly ser gly arg tyr pro arg gly trp gln val ser pro arg his pro ser thr ser phe
 182/61
 CGG GTG CAA CGA TCG GGC CAT GCC TGA CCG GGA GCA GAG CCA GCC ACC GGC CCA AGA AGA
 arg val gln arg ser gly his ala OPA arg gly ala glu pro ala thr gly pro arg arg
 242/81
 TGC GGA AGA CGA CTC GCG GCC CGA CGC CGC GGA GGC CGC CGC GGC CGA ACC CAA ATC ATC
 cys gly arg arg leu ala ala arg arg arg gly gly arg arg gly arg thr gln ile ile
 302/101
 AGC CGG TCC CGA TGT TCT CGA CCT ACG GTA TCG CCT CGA CAC TAC TCG GCG TGC TAT CGG
 ser arg ser arg cys ser arg pro thr val ser pro arg his tyr ser ala cys tyr arg
 362/121
 TCG CCG CGG TCG TGC TGG GTG CGA TGA TC
 ser pro arg ser cys trp val arg OPA

SEQ ID N° 18B

FIGURE 18B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

63/185

3/1 33/11
 CGA ACA GGT ACG GAA GGC GCC GTC GGT CGC TCG GTC CGC TGG TAT CTC GTG TTC AGC CAG
 arg thr gly thr glu gly ala val gly arg ser val arg trp tyr leu val phe ser gln
 63/21 93/31
 CCA GCG GCC GTT AAC GTG GCC GAA CAG GTC GTC TTG GGG TCG GGC ATC AGC GTC GAT GTG
 pro ala ala val asn val ala glu gln val val leu gly ser gly ile ser val asp val
 123/41 153/51
 GCT CAG GTC GAT ACC CGA GGG GAT GGC AAG TGT CAC CCC GCC ATC CTT CCA CCT CTT TTC
 ala gln val asp thr arg gly asp gly lys cys his pro ala ile leu pro pro leu phe
 183/61 213/71
 GGG TGC AAC GAT CGG GCC ATG CCT GAC GGG GAG CAG AGC CAG CCA CCG GCC CAA GAA GAT
 gly cys asn asp arg ala met pro asp gly glu gln ser gln pro pro ala gln glu asp
 243/81 273/91
 GCG GAA GAC GAC TCG CGG CCC GAC GCC GCG GAG GCC GCC GCG GCC GAA CCC AAA TCA TCA
 ala glu asp asp ser arg pro asp ala ala glu ala ala ala ala glu pro lys ser ser
 303/101 333/111
 GCC GGT CCC GAT GTT CTC GAC CTA CGG TAT CGC CTC GAC ACT ACT CGG CGT GCT ATC GGT
 ala gly pro asp val leu asp leu arg tyr arg leu asp thr thr arg arg ala ile gly
 363/121
 CGC CGC GGT CGT GCT GGG TGC GAT GAT C
 arg arg gly arg ala gly cys asp asp

SEQ ID N° 18C

FIGURE 18C

partie de la séquence nucléotidique de seq18A

1/1 31/11
 GAA GGC GCC GTC GGT CGC TCG GTC CGC TGG TAT CTC GTG TTC AGC CAG CCA GCG GCC GTT
 glu gly ala val gly arg ser val arg trp tyr leu val phe ser gln pro ala ala val
 61/21 91/31
 AAC GTG GCC GAA CAG GTC GTC TTG GGG TCG GGC ATC AGC GTC GAT GTG GCT CAG GTC GAT
 asn val ala glu gln val val leu gly ser gly ile ser val asp val ala gln val asp
 121/41 151/51
 ACC CGA GGG GAT GGC AAG TGT CAC CCC GCC ATC CTT CCA CCT CTT TTC GGG TGC AAC GAT
 thr arg gly asp gly lys cys his pro ala ile leu pro pro leu phe gly cys asn asp
 181/61 211/71
 CGG GCC ATG CCT GAC GGG GAG CAG AGC CAG CCA CCG GCC CAA GAA GAT GCG GAA GAC GAC
 arg ala met pro asp gly glu gln ser gln pro pro ala gln glu asp ala glu asp asp
 241/81 271/91
 TCG CGG CCC GAC GCC GCG GAG GCC GCC GCG GCC GAA CCC AAA TCA TCA GCC GGT CCG ATG
 ser arg pro asp ala ala glu ala ala ala ala glu pro lys ser ser ala gly pro met
 301/101 331/111
 TTC TCG ACC TAC GGT ATC GCC TCG ACA CTA CTC GGC GTG CTA TCG GTC GCC GCG GTC GTG
 phe ser thr tyr gly ile ala ser thr leu leu gly val leu ser val ala ala val val
 361/121
 CTG GGT GCG ATG ATC
 leu gly ala met ile

SEQ ID N° 18A'

FIGURE 18A'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

64/185

1/1 31/11
 CGG AAG GCG CCG TCG GTC GCT CGG TCC GCT GGT ATC TCG TGT TCA GCC AGC CAG CGG CCG
 arg lys ala pro ser val ala arg ser ala gly ile ser cys ser ala ser gln arg pro
 61/21 91/31
 TTA ACG TGG CCG AAC AGG TCG TCT TGG GGT CGG GCA TCA GCG TCG ATG TGG CTC AGG TCG
 leu thr trp pro asn arg ser ser trp gly arg ala ser ala ser met trp leu arg ser
 121/41 151/51
 ATA CCC GAG GGG ATG GCA AGT GTC ACC CCG CCA TCC TTC CAC CTC TTT TCG GGT GCA ACG
 ile pro glu gly met ala ser val thr pro pro ser phe his leu phe ser gly ala thr
 181/61 211/71
 ATC GGG CCA TGC CTG ACG GGG AGC AGA GCC AGC CAC CGG CCC AAG AAG ATG CGG AAG ACG
 ile gly pro cys leu thr gly ser arg ala ser his arg pro lys lys met arg lys thr
 241/81 271/91
 ACT CGC GGC CCG ACG CCG CGG AGG CCG CCG CGG CCG AAC CCA AAT CAT CAG CCG GTC CGA
 thr arg gly pro thr pro arg arg pro pro arg pro asn pro asn his gln pro val arg
 301/101 331/111
 TGT TCT CGA CCT ACG GTA TCG CCT CGA CAC TAC TCG GCG TGC TAT CGG TCG CCG CGG TCG
 cys ser arg pro thr val ser pro arg his tyr ser ala cys tyr arg ser pro arg ser
 361/121
 TGC TGG GTG CGA TGA TC
 cys trp val arg OPA

SEQ ID N° 18B'

FIGURE 18B'

1/1 31/11
 GGA AGG CGC CGT CGG TCG CTC GGT CCG CTG GTA TCT CGT GTT CAG CCA GCC AGC GGC CGT
 gly arg arg arg arg ser leu gly pro leu val ser arg val gln pro ala ser gly arg
 61/21 91/31
 TAA CGT GGC CGA ACA GGT CGT CTT GGG GTC GGG CAT CAG CGT CGA TGT GGC TCA GGT CGA
 OCH arg gly arg thr gly arg leu gly val gly his gln arg arg cys gly ser gly arg
 121/41 151/51
 TAC CCG AGG GGA TGG CAA GTG TCA CCC CGC CAT CCT TCC ACC TCT TTT CGG GTG CAA CGA
 tyr pro arg gly trp gln val ser pro arg his pro ser thr ser phe arg val gln arg
 181/61 211/71
 TCG GGC CAT GCC TGA CGG GGA GCA GAG CCA GCC ACC GGC CCA AGA AGA TGC GGA AGA CGA
 ser gly his ala OPA arg gly ala glu pro ala thr gly pro arg arg cys gly arg arg
 241/81 271/91
 CTC GCG GCC CGA CGC CGC GGA GGC CGC CGC GGC CGA ACC CAA ATC ATC AGC CGG TCC GAT
 leu ala ala arg arg arg gly gly arg arg gly arg thr gln ile ile ser arg ser asp
 301/101 331/111
 GTT CTC GAC CTA CGG TAT CGC CTC GAC ACT ACT CGG CGT GCT ATC GGT CGC CGC GGT CGT
 val leu asp leu arg tyr arg leu asp thr thr arg arg ala ile gly arg arg gly arg
 361/121
 GCT GGG TGC GAT GAT C
 ala gly cys asp asp

SEQ ID N° 18C'

FIGURE 18C'

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

65/185

séquence Rv0199 prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq18A'

```

1/1                               31/11
atg cct gac ggg gag cag agc cag cca ccg gcc caa gaa gat gcg gaa gac gac tcg cgg
Met pro asp gly glu gln ser gln pro pro ala gln glu asp ala glu asp asp ser arg
61/21                               91/31
ccc gac gcc gcg gag gcc gcc gcg gcc gaa ccc aaa tca tca gcc ggt ccg atg ttc tcg
pro asp ala ala glu ala ala ala ala glu pro lys ser ser ala gly pro met phe ser
121/41                               151/51
acc tac ggt atc gcc tcg aca cta ctc ggc gtg cta tcg gtc gcc gcg gtc gtg ctg ggt
thr tyr gly ile ala ser thr leu leu gly val leu ser val ala ala val val leu gly
181/61                               211/71
gcg atg atc tgg tcc gca cac cgc gat gac tcc ggc gag cgt acc tac ctg acc cgg gtc
ala met ile trp ser ala his arg asp asp ser gly glu arg thr tyr leu thr arg val
241/81                               271/91
atg ctg acc gcc gct gaa tgg acg gcc gtg ctg atc aac atg aac gcc gac aac atc gat
met leu thr ala ala glu trp thr ala val leu ile asn met asn ala asp asn ile asp
301/101                               331/111
gcc agc ctg cag cga ctg cac gac gga acg gtc ggt caa ctc aac acc gac ttc gac gct
ala ser leu gln arg leu his asp gly thr val gly gln leu asn thr asp phe asp ala
361/121                               391/131
gtc gtg cag ccc tac cgg cag gtg gtg gag aag ttg cgg acg cac agc agc ggc agg atc
val val gln pro tyr arg gln val val glu lys leu arg thr his ser ser gly arg ile
421/141                               451/151
gag gcg gta gcg atc gat acg gtg cac cgc gag ctg gat acc cag tcc ggt gcc gcc cga
glu ala val ala ile asp thr val his arg glu leu asp thr gln ser gly ala ala arg
481/161                               511/171
ccg gta gta acc acg aaa ttg cca ccg ttt gcc act cgc acc gac tcg gtg ctg ctg gtc
pro val val thr thr lys leu pro pro phe ala thr arg thr asp ser val leu leu val
541/181                               571/191
gcg acg tcg gtc agt gag aac gcc ggc gcc aaa ccc cag acc gtg cac tgg aac ttg cgg
ala thr ser val ser glu asn ala gly ala lys pro gln thr val his trp asn leu arg
601/201                               631/211
ctc gat gtc tcc gat gtg gac ggc aag ctg atg atc tcc cgg ttg gag tcg att cga tga
leu asp val ser asp val asp gly lys leu met ile ser arg leu glu ser ile arg OPA

```

SEQ ID N° 18D

FIGURE 18D

66/185

ORF d'après Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant Rv0199

1/1
 taa tcc gat gcc gga ttg ggt gaa atg cac
 OCH ser asp ala gly leu gly glu met his
 61/21
 atc gac ata gac tcc gat gcc gcc gcc cac
 ile asp ile asp ser asp ala ala ala his
 121/41
 ggc caa ttc ggt ggc gtc ggc cgc gct gtc
 gly gln phe gly gly val gly arg ala val
 181/61
 cac ccc tgc gcg ctc gac ggc ttc ctc gtc
 his pro cys ala leu asp gly phe leu val
 241/81
 ctg cgc atc ggt gcc tac cgc agc acc tgc
 leu arg ile gly ala tyr arg ser thr cys
 301/101
 ttg tgt ctc ggc gcg gtc gaa cag gct acg
 leu cys leu gly ala val glu gln ala thr
 361/121
 tat ctc gtg ttc agc cag cca gcg gcc gtt
 tyr leu val phe ser gln pro ala ala val
 421/141
 ggc atc agc gtc gat gtg gct cag gtc gat
 gly ile ser val asp val ala gln val asp
 481/161
 atc ctt cca cct ctt ttc ggg tgc aac gat
 ile leu pro pro leu phe gly cys asn asp
 541/181
 cca ccg gcc caa gaa gat gcg gaa gac gac
 pro pro ala gln glu asp ala glu asp asp
 601/201
 gcc gaa ccc aaa tca tca gcc ggt ccg atg
 ala glu pro lys ser ser ala gly pro met
 661/221
 ctc ggc gtg cta tcg gtc gcc gcg gtc gtg
 leu gly val leu ser val ala ala val val
 721/241
 gat gac tcc ggc gag cgt acc tac ctg acc
 asp asp ser gly glu arg thr tyr leu thr
 781/261
 gcc gtg ctg atc aac atg aac gcc gac aac
 ala val leu ile asn met asn ala asp asn
 841/281
 gga acg gtc ggt caa ctc aac acc gac ttc
 gly thr val gly gln leu asn thr asp phe
 901/301
 gtg gag aag ttg cgg acg cac agc agc ggc
 val glu lys leu arg thr his ser ser gly
 961/321
 cac cgc gag ctg gat acc cag tcc ggt gcc
 his arg glu leu asp thr gln ser gly ala
 1021/341
 ccg ttt gcc act cgc acc gac tcg gtg ctg
 pro phe ala thr arg thr asp ser val leu
 1081/361
 ggc gcc aaa ccc cag acc gtg cac tgg aac
 gly ala lys pro gln thr val his trp asn
 1141/381
 aag ctg atg atc tcc ccg ttg gag tcg att cga tga
 lys leu met ile ser arg leu glu ser ile arg OPA

31/11
 caa gta acg ggt cga gtc ttt gga atc ggt
 gln val thr gly arg val phe gly ile gly
 91/31
 gcc ggc acg ttg cag agt gcc aag ggc ggc
 ala gly thr leu gln ser ala lys gly gly
 151/51
 aat cgt ggc caa ttc gtc gtg cag cgg ttg
 asn arg gly gln phe val val gln arg leu
 211/71
 gag gaa gct ggc gta gag gtc gcc gat gcg
 glu glu ala gly val glu val ala asp ala
 271/91
 ttg gct ggc ctg gat gat cag gtc tcg cac
 leu ala gly leu asp asp gln val ser his
 331/111
 gaa ggc gcc gtc ggt cgc tcg gtc cgc tgg
 glu gly ala val gly arg ser val arg trp
 391/131
 aac gtg gcc gaa cag gtc gtc ttg ggg tcg
 asn val ala glu gln val val leu gly ser
 451/151
 acc cga ggg gat ggc aag tgt cac ccc gcc
 thr arg gly asp gly lys cys his pro ala
 511/171
 ccg gcc atg cct gac ggg gag cag agc cag
 arg ala met pro asp gly glu gln ser gln
 571/191
 tcg ccg ccc gac gcc gcg gag gcc gcc gcg
 ser arg pro asp ala ala glu ala ala ala
 631/211
 ttc tcg acc tac ggt atc gcc tcg aca cta
 phe ser thr tyr gly ile ala ser thr leu
 691/231
 ctg ggt gcg atg atc tgg tcc gca cac cgc
 leu gly ala met ile trp ser ala his arg
 751/251
 ccg gtc atg ctg acc gcc gct gaa tgg acg
 arg val met leu thr ala ala glu trp thr
 811/271
 gcc agc ctg cag cga ctg cac gac
 ile asp ala ser leu gln arg leu his asp
 871/291
 gac gct gtc gtg cag ccc tac ccg cag gtg
 asp ala val val gln pro tyr arg gln val
 931/311
 agg atc gag gcg gta gcg atc gat acg gtg
 arg ile glu ala val ala ile asp thr val
 991/331
 gcc cga ccg gta gta acc acg aaa ttg cca
 ala arg pro val val thr thr lys leu pro
 1051/351
 ctg gtc gcg acg tcg gtc agt gag aac gcc
 leu val ala thr ser val ser glu asn ala
 1111/371
 ttg ccg ctc gat gtc tcc gat gtg gac ggc
 leu arg leu asp val ser asp val asp gly
 1171/391

SEQ ID N° 18F

FIGURE 18F
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

67/185

31/11
 GTT GCG CAA CGG GGT GAG CAC CGA CGC GAT GAT GGC GCA ACT ATC GAA ACT GCA GGA CAT
 val ala gln arg gly glu his arg arg asp asp gly ala thr ile glu thr ala gly his
 61/21 91/31
 CGC CAA CGC CAA CGA CGG CAC TCG CGC GGT GGG CAC CCC TGG CTA TCA GGC CAG CGT CGA
 arg gln arg gln arg arg his ser arg gly gly his pro trp leu ser gly gln arg arg
 121/41 151/51
 CTA TGT GGT AAA CAC ACT GCG CAA CAG CGG TTT TGA TGT GCA AAC CCC GGA GTT CTC CGC
 leu cys gly lys his thr ala gln gln arg phe OPA cys ala asn pro gly val leu arg
 181/61 211/71
 TCG CGT GTT CAA GGC CGA AAA AGG GGT GGT GAC CCT CGG CGG CAA CAC CGT GGA GGC GAG
 ser arg val gln gly arg lys arg gly gly asp pro arg arg gln his arg gly gly glu
 241/81 271/91
 GGC GCT CGA GTA CAG CCT CGG CAC ACC GCC GGA CGG GGT GAC GGG CCC GCT GGT GGC TGC
 gly ala arg val gln pro arg his thr ala gly arg gly asp gly pro ala gly gly cys
 301/101 331/111
 CCC CGC CGA CGA CAG TCC GGG CTG CAG TCC GTC GGA CTA CGA CAG GCT GCC GGT GTC CGG
 pro arg arg arg gln ser gly leu gln ser val gly leu arg gln ala ala gly val arg
 361/121
 TGC GGT GGT GCT GGT AGA TC
 cys gly gly ala gly arg

SEQ ID N° 19A

FIGURE 19A

32/11
 TTG CGC AAC GGG GTG AGC ACC GAC GCG ATG ATG GCG CAA CTA TCG AAA CTG CAG GAC ATC
 leu arg asn gly val ser thr asp ala met met ala gln leu ser lys leu gln asp ile
 62/21 92/31
 GCC AAC GCC AAC GAC GGC ACT CGC GCG GTG GGC ACC CCT GGC TAT CAG GCC AGC GTC GAC
 ala asn ala asn asp gly thr arg ala val gly thr pro gly tyr gln ala ser val asp
 122/41 152/51
 TAT GTG GTA AAC ACA CTG CGC AAC AGC GGT TTT GAT GTG CAA ACC CCG GAG TTC TCC GCT
 tyr val val asn thr leu arg asn ser gly phe asp val gln thr pro glu phe ser ala
 182/61 212/71
 CGC GTG TTC AAG GCC GAA AAA GGG GTG GTG ACC CTC GGC GGC AAC ACC GTG GAG GCG AGG
 arg val phe lys ala glu lys gly val val thr leu gly gly asn thr val glu ala arg
 242/81 272/91
 GCG CTC GAG TAC AGC CTC GGC ACA CCG CCG GAC GGG GTG ACG GGC CCG CTG GTG GCT GCC
 ala leu glu tyr ser leu gly thr pro pro asp gly val thr gly pro leu val ala ala
 302/101 332/111
 CCC GCC GAC GAC AGT CCG GGC TGC AGT CCG TCG GAC TAC GAC AGG CTG CCG GTG TCC GGT
 pro ala asp asp ser pro gly cys ser pro ser asp tyr asp arg leu pro val ser gly
 362/121
 GCG GTG GTG CTG GTA GAT C
 ala val val leu val asp

SEQ ID N° 19B

FIGURE 19B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

68/185

33/11
TGC GCA ACG GGG TGA GCA CCG ACG CGA TGA TGG CGC AAC TAT CGA AAC TGC AGG ACA TCG
cys ala thr gly OPA ala pro thr arg OPA trp arg asn tyr arg asn cys arg thr ser
63/21 93/31
CCA ACG CCA ACG ACG GCA CTC GCG CGG TGG GCA CCC CTG GCT ATC AGG CCA GCG TCG ACT
pro thr pro thr thr ala leu ala arg trp ala pro leu ala ile arg pro ala ser thr
123/41 153/51
ATG TGG TAA ACA CAC TGC GCA ACA GCG GTT TTG ATG TGC AAA CCC CGG AGT TCT CCG CTC
met trp OCH thr his cys ala thr ala val leu met cys lys pro arg ser ser pro leu
183/61 213/71
GCG TGT TCA AGG CCG AAA AAG GGG TGG TGA CCC TCG GCG GCA ACA CCG TGG AGG CGA GGG
ala cys ser arg pro lys lys gly trp OPA pro ser ala ala thr pro trp arg arg gly
243/81 273/91
CGC TCG AGT ACA GCC TCG GCA CAC CGC CGG ACG GGG TGA CGG GCC CGC TGG TGG CTG CCC
arg ser ser thr ala ser ala his arg arg thr gly OPA arg ala arg trp trp leu pro
303/101 333/111
CCG CCG ACG ACA GTC CGG GCT GCA GTC CGT CGG ACT ACG ACA GGC TGC CGG TGT CCG GTG
pro pro thr thr val arg ala ala val arg arg thr thr thr gly cys arg cys pro val
363/121
CGG TGG TGC TGG TAG ATC
arg trp cys trp AMB ile

SEQ ID N° 19C

FIGURE 19C

partie de la séquence nucléotidique de seq19A

1/1 31/11
CTA TCG AAA CTG CAG GAC ATC GCC AAC GCC AAC GAC GGC ACT CGC GCG GTG GGC ACC CCT
leu ser lys leu gln asp ile ala asn ala asn asp gly thr arg ala val gly thr pro
61/21 91/31
GGC TAT CAG GCC AGC GTC GAC TAT GTG GTA AAC ACA CTG CGC AAC AGC GGT TTT GAT GTG
gly tyr gln ala ser val asp tyr val val asn thr leu arg asn ser gly phe asp val
121/41 151/51
CAA ACC CCG GAG TTC TCC GCT CGC GTG TTC AAG GCC GAA AAA GGG GTG GTG ACC CTC GGC
gln thr pro glu phe ser ala arg val phe lys ala glu lys gly val val thr leu gly
181/61 211/71
GGC AAC ACC GTG GAG GCG AGG GCG CTC GAG TAC AGC CTC GGC ACA CCG CCG GAC GGG GTG
gly asn thr val glu ala arg ala leu glu tyr ser leu gly thr pro pro asp gly val
241/81 271/91
ACG GGC CCG CTG GTG GCT GCC CCC GCC GAC GAC AGT CCG GGC TGC AGT CCG TCG GAC TAC
thr gly pro leu val ala ala pro ala asp asp ser pro gly cys ser pro ser asp tyr
301/101 331/111
GAC AGG CTG CCG GTG TCC GGT GCG GTG GTG CTG GTA GAT C
asp arg leu pro val ser gly ala val val leu val asp

SEQ ID N° 19A'

FIGURE 19A

69/185

1/1 31/11
TAT CGA AAC TGC AGG ACA TCG CCA ACG CCA ACG ACG GCA CTC GCG CGG TGG GCA CCC CTG
tyr arg asn cys arg thr ser pro thr pro thr thr ala leu ala arg trp ala pro leu
61/21 91/31
GCT ATC AGG CCA GCG TCG ACT ATG TGG TAA ACA CAC TGC GCA ACA GCG GTT TTG ATG TGC
ala ile arg pro ala ser thr met trp OCH thr his cys ala thr ala val leu met cys
121/41 151/51
AAA CCC CGG AGT TCT CCG CTC GCG TGT TCA AGG CCG AAA AAG GGG TGG TGA CCC TCG GCG
lys pro arg ser ser pro leu ala cys ser arg pro lys lys gly trp OPA pro ser ala
181/61 211/71
GCA ACA CCG TGG AGG CGA GGG CGC TCG AGT ACA GCC TCG GCA CAC CGC CGG ACG GGG TGA
ala thr pro trp arg arg gly arg ser ser thr ala ser ala his arg arg thr gly OPA
241/81 271/91
CGG GCC CGC TGG TGG CTG CCC CCG CCG ACG ACA GTC CGG GCT GCA GTC CGT CGG ACT ACG
arg ala arg trp trp leu pro pro pro thr thr val arg ala ala val arg arg thr thr
301/101 331/111
ACA GGC TGC CGG TGT CCG GTG CGG TGG TGC TGG TAG ATC
thr gly cys arg cys pro val arg trp cys trp AMB ile

SEQ ID N° 19B'

FIGURE 19B'

1/1 31/11
ATC GAA ACT GCA GGA CAT CGC CAA CGC CAA CGA CGG CAC TCG CGC GGT GGG CAC CCC TGG
ile glu thr ala gly his arg gln arg gln arg arg his ser arg gly gly his pro trp
61/21 91/31
CTA TCA GGC CAG CGT CGA CTA TGT GGT AAA CAC ACT GCG CAA CAG CGG TTT TGA TGT GCA
leu ser gly gln arg arg leu cys gly lys his thr ala gln gln arg phe OPA cys ala
121/41 151/51
AAC CCC GGA GTT CTC CGC TCG CGT GTT CAA GGC CGA AAA AGG GGT GGT GAC CCT CGG CGG
asn pro gly val leu arg ser arg val gln gly arg lys arg gly gly asp pro arg arg
181/61 211/71
CAA CAC CGT GGA GGC GAG GGC GCT CGA GTA CAG CCT CGG CAC ACC GCC GGA CGG GGT GAC
gln his arg gly gly glu gly ala arg val gln pro arg his thr ala gly arg gly asp
241/81 271/91
GGG CCC GCT GGT GGC TGC CCC CGC CGA CGA CAG TCC GGG CTG CAG TCC GTC GGA CTA CGA
gly pro ala gly gly cys pro arg arg arg gln ser gly leu gln ser val gly leu arg
301/101 331/111
CAG GCT GCC GGT GTC CGG TGC GGT GGT GCT GGT AGA TC
gln ala ala gly val arg cys gly gly ala gly arg

SEQ ID N° 19C'

FIGURE 19C'

70/185

sequence Rv0418 prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq19A'

1/1	31/11
atg gtg aac aaa tcc agg atg atg ccg gcg	gtg ctg gcc gtg gct gtg gtc gtc gca ttc
Met val asn lys ser arg met met pro ala	val leu ala val ala val val val ala phe
61/21	91/31
ctg acg acg ggc tgt atc cgg tgg tct acg	cag tcg cgg ccc gtt gtt aac ggc ccc gct
leu thr thr gly cys ile arg trp ser thr	gln ser arg pro val val asn gly pro ala
121/41	151/51
gcc gca gag ttc gcc gtt gcg ttg cgc aac	cgg gtg agc acc gac gcg atg atg gcg cac
ala ala glu phe ala val ala leu arg asn	arg val ser thr asp ala met met ala his
181/61	211/71
cta tcg aaa ctg cag gac atc gcc aac gcc	aac gac ggc act cgc gcg gtg ggc acc cct
leu ser lys leu gln asp ile ala asn ala	asn asp gly thr arg ala val gly thr pro
241/81	271/91
ggc tat cag gcc agc gtc gac tat gtg gta	aac aca ctg cgc aac agc ggt ttt gat gtg
gly tyr gln ala ser val asp tyr val val	asn thr leu arg asn ser gly phe asp val
301/101	331/111
caa acc ccg gag ttc tcc gct cgc gtg ttc	aag gcc gaa aaa ggg gtg gtg acc ctc ggc
gln thr pro glu phe ser ala arg val phe	lys ala glu lys gly val val thr leu gly
361/121	391/131
ggc aac acc gtg gag gcg agg gcg ctc gag	tac agc ctc ggc aca ccg ccg gac ggg gtg
gly asn thr val glu ala arg ala leu glu	tyr ser leu gly thr pro pro asp gly val
421/141	451/151
acg ggc ccg ctg gtg gct gcc ccc gcc gac	gac agt ccg ggc tgc agt ccg tcg gac tac
thr gly pro leu val ala ala pro ala asp	asp ser pro gly cys ser pro ser asp tyr
481/161	511/171
gac agg ctg ccg gtg tcc ggt gcg gtg gtg	ctg gta gat cgc ggc gtc tgt cct ttt gcc
asp arg leu pro val ser gly ala val val	leu val asp arg gly val cys pro phe ala
541/181	571/191
cag aag gaa gac gca gcc gcg cag cgc ggt	gcg gtg gcg ctg atc att gct gac aac atc
gln lys glu asp ala ala ala gln arg gly	ala val ala leu ile ile ala asp asn ile
601/201	631/211
gac gag cag gcg atg ggc ggc acc ctg ggg	gct aat acc gac gtc aag atc ccg gtg gtg
asp glu gln ala met gly gly thr leu gly	ala asn thr asp val lys ile pro val val
661/221	691/231
agt gtc acc aag tcg gtc gga ttc cag cta	cgc gga cag tct ggg cca acc acc gtc aag
ser val thr lys ser val gly phe gln leu	arg gly gln ser gly pro thr thr val lys
721/241	751/251
ctc acg gcg agc acc caa agt ttc aag gcc	cgc aac gtc atc gcg cag acg aag acg ggg
leu thr ala ser thr gln ser phe lys ala	arg asn val ile ala gln thr lys thr gly
781/261	811/271
tcg tcg gcc aac gtg gtg atg gca ggt gcg	cat ttg gac agc gtt ccg gaa gga ccc ggc
ser ser ala asn val val met ala gly ala	his leu asp ser val pro glu gly pro gly
841/281	871/291
atc aac gac aac ggc tcg gga gtg gct gcg	ggt ctg gaa acg gca gtg cag ctg ggg aac
ile asn asp asn gly ser gly val ala ala	val leu glu thr ala val gln leu gly asn
901/301	931/311
tca ccg cat gtg tcc aac gcg gta cgg ttc	gcc ttc tgg ggc gcc gag gaa ttc gcc ctg
ser pro his val ser asn ala val arg phe	ala phe trp gly ala glu glu phe gly leu
961/321	991/331
att ggg tca cga aac tac gtc gag tcg ctg	gac atc gac gcg ctc aaa ggc atc gcg ctg
ile gly ser arg asn tyr val glu ser leu	asp ile asp ala leu lys gly ile ala leu

SEQ ID N° 19 D

FIGURE 19D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

71/185

1021/341
tat ctg aac ttc gac atg ttg gcg tcg ccg aac ccg ggt tac ttc acc tac gac ggt gac
tyr leu asn phe asp met leu ala ser pro asn pro gly tyr phe thr tyr asp gly asp
1081/361
cag tcg ctg ccg cta gac gcc cgc ggt cag ccg gtg gtg ccc gaa ggc tcg gcc ggt atc
gln ser leu pro leu asp ala arg gly gln pro val val pro glu gly ser ala gly ile
1141/381
gag cgc acg ttc gtc gcc tat ctg aag atg gcc ggc aag acc gcg cag gac acc tcg ttc
glu arg thr phe val ala tyr leu lys met ala gly lys thr ala gln asp thr ser phe
1201/401
gac ggt cgg tcc gac tac gac ggc ttc acg ctg gcg ggt atc cct tcg ggt ggc ctg ttc
asp gly arg ser asp tyr asp gly phe thr leu ala gly ile pro ser gly gly leu phe
1261/421
tcc ggc gct gag gtc aag aag tcc gcc gag caa gcc gag ctc tgg ggc ggc acc gcc gac
ser gly ala glu val lys lys ser ala glu gln ala glu leu trp gly gly thr ala asp
1321/441
gag cct ttc gat ccc aac tat cac cag aag aca gac acc ctg gac cat atc gac cgc acc
glu pro phe asp pro asn tyr his gln lys thr asp thr leu asp his ile asp arg thr
1381/461
gcg ctc ggt atc aac ggc gct ggc gtc gcg tac gcg gtg ggt ttg tat gcg cag gac ctc
ala leu gly ile asn gly ala gly val ala tyr ala val gly leu tyr ala gln asp leu
1441/481
ggc ggc ccc aac ggg gtt ccg gtc atg gcg gac cgc acc cgc cac ctg att gcc aaa ccg
gly gly pro asn gly val pro val met ala asp arg thr arg his leu ile ala lys pro
1501/501
tga
OPA

SEQ ID N° 19D (suite)

FIGURE 19D (suite)

72/185

ORF d'après Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant Rv0418

```

1/1                                31/11
tag gcc att caa cgc tct gtt cgt ttg att ggt cgg tgg gat gcg aaa gct gcg cgg cga
AMB ala ile gln arg ser val arg leu ile gly arg trp asp ala lys ala ala arg arg
61/21                                91/31
cag gcg cgg tct aat ctg ggc gcg atg gtg aac aaa tcc agg atg atg ccg gcg gtg ctg
gln ala arg ser asn leu gly ala met val asn lys ser arg met met pro ala val leu
121/41                                151/51
gcc gtg gct gtg gtc gtc gca ttc ctg acg acg ggc tgt atc cgg tgg tct acg cag tcg
ala val ala val val val ala phe leu thr thr gly cys ile arg trp ser thr gln ser
181/61                                211/71
cgg ccc gtt gtt aac ggc ccc gct gcc gca gag ttc gcc gtt gcg ttg cgc aac cgg gtg
arg pro val val asn gly pro ala ala ala glu phe ala val ala leu arg asn arg val
241/81                                271/91
agc acc gac gcg atg atg gcg cac cta tgc aaa ctg cag gac atc gcc aac gcc aac gac
ser thr asp ala met met ala his leu ser lys leu gln asp ile ala asn ala asn asp
301/101                                331/111
ggc act cgc gcg gtg ggc acc cct ggc tat cag gcc agc gtc gac tat gtg gta aac aca
gly thr arg ala val gly thr pro gly tyr gln ala ser val asp tyr val val asn thr
361/121                                391/131
ctg cgc aac agc ggt ttt gat gtg caa acc ccg gag ttc tcc gct cgc gtg ttc aag gcc
leu arg asn ser gly phe asp val gln thr pro glu phe ser ala arg val phe lys ala
421/141                                451/151
gaa aaa ggg gtg gtg acc ctc ggc ggc aac acc gtg gag gcg agg gcg ctc gag tac agc
glu lys gly val val thr leu gly gly asn thr val glu ala arg ala leu glu tyr ser
481/161                                511/171
ctc ggc aca ccg ccg gac ggg gtg acg ggc ccg ctg gtg gct gcc ccc gcc gac gac agt
leu gly thr pro pro asp gly val thr gly pro leu val ala ala pro ala asp asp ser
541/181                                571/191
ccg ggc tgc agt ccg tgc gac tac gac agg ctg ccg gtg tcc ggt gcg gtg gtg ctg gta
pro gly cys ser pro ser asp tyr asp arg leu pro val ser gly ala val val leu val
601/201                                631/211
gat cgc ggc gtc tgt cct ttt gcc cag aag gaa gac gca gcc gcg cag cgc ggt gcg gtg
asp arg gly val cys pro phe ala gln lys glu asp ala ala ala gln arg gly ala val
661/221                                691/231
gcg ctg atc att gct gac aac atc gac gag cag gcg atg ggc ggc acc ctg ggg gct aat
ala leu ile ile ala asp asn ile asp glu gln ala met gly gly thr leu gly ala asn
721/241                                751/251
acc gac gtc aag atc ccg gtg gtg agt gtc acc aag tgc gtc gga ttc cag cta cgc gga
thr asp val lys ile pro val val ser val thr lys ser val gly phe gln leu arg gly
781/261                                811/271
cag tct ggg cca acc acc gtc aag ctc acg gcg agc acc caa agt ttc aag gcc cgc aac
gln ser gly pro thr thr val lys leu thr ala ser thr gln ser phe lys ala arg asn
841/281                                871/291
gtc atc gcg cag acg aag acg ggg tgc tgc gcc aac gtg gtg atg gca ggt gcg cat ttg
val ile ala gln thr lys thr gly ser ser ala asn val val met ala gly ala his leu
901/301                                931/311
gac agc gtt ccg gaa gga ccc ggc atc aac gac aac ggc tgc gga gtg gct gcg gtt ctg
asp ser val pro glu gly pro gly ile asn asp asn gly ser gly val ala ala val leu
961/321                                991/331
gaa acg gca gtg cag ctg ggg aac tca ccg cat gtg tcc aac gcg gta cgg ttc gcc ttc
glu thr ala val gln leu gly asn ser pro his val ser asn ala val arg phe ala phe

```

SEQ ID N° 19 F

FIGURE 19F
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

73/185

1021/341 1051/351
 tgg ggc gcc gag gaa ttc ggc ctg att ggg tca cga aac tac gtc gag tcg ctg gac atc
 trp gly ala glu glu phe gly leu ile gly ser arg asn tyr val glu ser leu asp ile
 1081/361 1111/371
 gac gcg ctc aaa ggc atc gcg ctg tat ctg aac ttc gac atg ttg gcg tcg ccg aac ccg
 asp ala leu lys gly ile ala leu tyr leu asn phe asp met leu ala ser pro asn pro
 1141/381 1171/391
 ggt tac ttc acc tac gac ggt gac cag tcg ctg ccg cta gac gcc cgc ggt cag ccg gtg
 gly tyr phe thr tyr asp gly asp gln ser leu pro leu asp ala arg gly gln pro val
 1201/401 1231/411
 gtg ccc gaa ggc tcg gcc ggt atc gag cgc acg ttc gtc gcc tat ctg aag atg gcc ggc
 val pro glu gly ser ala gly ile glu arg thr phe val ala tyr leu lys met ala gly
 1261/421 1291/431
 aag acc gcg cag gac acc tcg ttc gac ggt cgg tcc gac tac gac ggc ttc acg ctg gcg
 lys thr ala gln asp thr ser phe asp gly arg ser asp tyr asp gly phe thr leu ala
 1321/441 1351/451
 ggt atc cct tcg ggt ggc ctg ttc tcc gcc gct gag gtc aag aag tcc gcc gag caa gcc
 gly ile pro ser gly gly leu phe ser gly ala glu val lys lys ser ala glu gln ala
 1381/461 1411/471
 gag ctc tgg ggc ggc acc gcc gac gag cct ttc gat ccc aac tat cac cag aag aca gac
 glu leu trp gly gly thr ala asp glu pro phe asp pro asn tyr his gln lys thr asp
 1441/481 1471/491
 acc ctg gac cat atc gac cgc acc gcg ctc ggt atc aac ggc gct ggc gtc gcg tac gcg
 thr leu asp his ile asp arg thr ala leu gly ile asn gly ala gly val ala tyr ala
 1501/501 1531/511
 gtg ggt ttg tat gcg cag gac ctc ggc gcc ccc aac ggg gtt ccg gtc atg gcg gac cgc
 val gly leu tyr ala gln asp leu gly gly pro asn gly val pro val met ala asp arg
 1561/521
 acc cgc cac ctg att gcc aaa ccg tga
 thr arg his leu ile ala lys pro OPA

SEQ ID N° 19F (suite)

FIGURE 19F (suite)

31/11
 CGA GAC AGT GGT GCG GGA CAC TTG AGT TCG GCT GCT AAC GAC GCC AGA GTC GCC CGC TTC
 arg asp ser gly ala gly his leu ser ser ala ala asn asp ala arg val ala arg phe
 61/21 91/31
 CGC GGT GTG GGA CTC ACG TTC GGT GAG GGT ACA GCG GAC CTT CGA GCA CGC AAT ATC GTG
 arg gly val gly leu thr phe gly glu gly thr ala asp leu arg ala arg asn ile val
 121/41 151/51
 GGC CGG CTG GCA ACC GTC GGT TTC GAC GTT GGT GAC GAC CCC TCG TTC ATG AAT CGT TCT
 gly arg leu ala thr val gly phe asp val gly asp asp pro ser phe met asn arg ser
 181/61 211/71
 TGA GCT CCC CGT TTT GCT GGA TGC CCA GGC ACC GCC GGT ACT GCT GCG CTT AAG CTT GTC
 OPA ala pro arg phe ala gly cys pro gly thr ala gly thr ala ala leu lys leu val
 241/81 271/91
 GCA CAT GGT GCC GGC AGG GAG GAA CAG TGG GCA AGC AGC TAG CCG CGC TCG CCG CGC TGG
 ala his gly ala gly arg glu glu gln trp ala ser ser AMB pro arg ser pro arg trp
 301/101 331/111
 TCG GTG CGT GCA TGC TCG CAG CCG GAT GCA CCA ACG TGG TCG ACG GGA CCG CCG TGG CTG
 ser val arg ala cys ser gln pro asp ala pro thr trp ser thr gly pro pro trp leu
 361/121
 CCG ACA AAT CCG GAC CAC TGC ATC AGG ATC
 pro thr asn pro asp his cys ile arg ile

SEQ ID N° 20A

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 20A

74/185

32/11

GAG ACA GTG GTG CGG GAC ACT TGA GTT CGG CTG CTA ACG ACG CCA GAG TCG CCC GCT TCC
 glu thr val val arg asp thr OPA val arg leu leu thr thr pro glu ser pro ala ser
 62/21 92/31

GCG GTG TGG GAC TCA CGT TCG GTG AGG GTA CAG CGG ACC TTC GAG CAC GCA ATA TCG TGG
 ala val trp asp ser arg ser val arg val gln arg thr phe glu his ala ile ser trp
 122/41 152/51

GCC GGC TGG CAA CCG TCG GTT TCG ACG TTG GTG ACG ACC CCT CGT TCA TGA ATC GTT CTT
 ala gly trp gln pro ser val ser thr leu val thr thr pro arg ser OPA ile val leu
 182/61 212/71

GAG CTC CCC GTT TTG CTG GAT GCC CAG GCA CCG CCG GTA CTG CTG CGC TTA AGC TTG TCG
 glu leu pro val leu leu asp ala gln ala pro pro val leu leu arg leu ser leu ser
 242/81 272/91

CAC ATG GTG CCG GCA GGG AGG AAC AGT GGG CAA GCA GCT AGC CGC GCT CGC CGC GCT GGT
 his met val pro ala gly arg asn ser gly gln ala ala ser arg ala arg arg ala gly
 302/101 332/111

CGG TGC GTG CAT GCT CGC AGC CGG ATG CAC CAA CGT GGT CGA CGG GAC CGC CGT GGC TGC
 arg cys val his ala arg ser arg met his gln arg gly arg arg asp arg arg gly cys
 362/121

CGA CAA ATC CGG ACC ACT GCA TCA GGA TC
 arg gln ile arg thr thr ala ser gly

SEQ ID N° 20B

FIGURE 20B

33/11

AGA CAG TGG TGC GGG ACA CTT GAG TTC GGC TGC TAA CGA CGC CAG AGT CGC CCG CTT CCG
 arg gln trp cys gly thr leu glu phe gly cys OCH arg arg gln ser arg pro leu pro
 63/21 93/31

CGG TGT GGG ACT CAC GTT CGG TGA GGG TAC AGC GGA CCT TCG AGC ACG CAA TAT CGT GGG
 arg cys gly thr his val arg OPA gly tyr ser gly pro ser ser thr gln tyr arg gly
 123/41 153/51

CCG GCT GGC AAC CGT CGG TTT CGA CGT TGG TGA CGA CCC CTC GTT CAT GAA TCG TTC TTG
 pro ala gly asn arg arg phe arg arg trp OPA arg pro leu val his glu ser phe leu
 183/61 213/71

AGC TCC CCG TTT TGC TGG ATG CCC AGG CAC CGC CGG TAC TGC TGC GCT TAA GCT TGT CGC
 ser ser pro phe cys trp met pro arg his arg arg tyr cys cys ala OCH ala cys arg
 243/81 273/91

ACA TGG TGC CGG CAG GGA GGA ACA GTG GGC AAG CAG CTA GCC GCG CTC GCC GCG CTG GTC
 thr trp cys arg gln gly gly thr val gly lys gln leu ala ala leu ala ala leu val
 303/101 333/111

GGT GCG TGC ATG CTC GCA GCC GGA TGC ACC AAC GTG GTC GAC GGG ACC GCC GTG GCT GCC
 gly ala cys met leu ala ala gly cys thr asn val val asp gly thr ala val ala ala
 363/121

GAC AAA TCC GGA CCA CTG CAT CAG GAT C
 asp lys ser gly pro leu his gln asp

SEQ ID N° 20C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

75/185

partie de la séquence nucléotidique de seq20A

```

1/1                               31/11
TGT GGG ACT CAC GTT CGG TGA GGG TAC AGC GGA CCT TCG AGC ACG CAA TAT CGT GGG CCG
cys gly thr his val arg OPA gly tyr ser gly pro ser ser thr gln tyr arg gly pro
61/21                               91/31
GCT GGC AAC CGT CGG TTT CGA CGT TGG TGA CGA CCC CTC GTT CAT GAA TCG TTC TTG AGC
ala gly asn arg arg phe arg arg trp OPA arg pro leu val his glu ser phe leu ser
121/41                               151/51
TCC CCG TTT TGC TGG ATG CCC AGG CAC CGC CGG TAC TGC TGC GCT TAA GCT TGT CGC ACA
ser pro phe cys trp met pro arg his arg arg tyr cys cys ala OCH ala cys arg thr
181/61                               211/71
TGG TGC CGG CAG GGA GGA ACA GTG GGC AAG CAG CTA GCC GCG CTC GCC GCG CTG GTC GGT
trp cys arg gln gly gly thr val gly lys gln leu ala ala leu ala ala leu val gly
241/81                               271/91
GCG TGC ATG CTC GCA GCC GGA TGC ACC AAC GTG GTC GAC GGG ACC GCC GTG GCT GCC GAC
ala cys met leu ala ala gly cys thr asn val val asp gly thr ala val ala ala asp
301/101
AAA TCC GGA CCA CTG CAT CAG GAT C
lys ser gly pro leu his gln asp

```

SEQ ID N° 20A'

FIGURE 20A'

```

1/1                               31/11
GTG GGA CTC ACG TTC GGT GAG GGT ACA GCG GAC CTT CGA GCA CGC AAT ATC GTG GGC CGG
val gly leu thr phe gly glu gly thr ala asp leu arg ala arg asn ile val gly arg
61/21                               91/31
CTG GCA ACC GTC GGT TTC GAC GTT GGT GAC GAC CCC TCG TTC ATG AAT CGT TCT TGA GCT
leu ala thr val gly phe asp val gly asp asp pro ser phe met asn arg ser OPA ala
121/41                               151/51
CCC CGT TTT GCT GGA TGC CCA GGC ACC GCC GGT ACT GCT GCG CTT AAG CTT GTC GCA CAT
pro arg phe ala gly cys pro gly thr ala gly thr ala ala leu lys leu val ala his
181/61                               211/71
GGT GCC GGC AGG GAG GAA CAG TGG GCA AGC AGC TAG CCG CGC TCG CCG CGC TGG TCG GTG
gly ala gly arg glu glu gln trp ala ser ser AMB pro arg ser pro arg trp ser val
241/81                               271/91
CGT GCA TGC TCG CAG CCG GAT GCA CCA ACG TGG TCG ACG GGA CCG CCG TGG CTG CCG ACA
arg ala cys ser gln pro asp ala pro thr trp ser thr gly pro pro trp leu pro thr
301/101
AAT CCG GAC CAC TGC ATC AGG ATC
asn pro asp his cys ile arg ile

```

SEQ ID N° 20B'

FIGURE 20B'

76/185

1/1 31/11
 GTG TGG GAC TCA CGT TCG GTG AGG GTA CAG CGG ACC TTC GAG CAC GCA ATA TCG TGG GCC
 val trp asp ser arg ser val arg val gln arg thr phe glu his ala ile ser trp ala
 61/21 91/31
 GGC TGG CAA CCG TCG GTT TCG ACG TTG GTG ACG ACC CCT CGT TCA TGA ATC GTT CTT GAG
 gly trp gln pro ser val ser thr leu val thr thr pro arg ser OPA ile val leu glu
 121/41 151/51
 CTC CCC GTT TTG CTG GAT GCC CAG GCA CCG CCG GTA CTG CTG CGC TTA AGC TTG TCG CAC
 leu pro val leu leu asp ala gln ala pro pro val leu leu arg leu ser leu ser his
 181/61 211/71
 ATG GTG CCG GCA GGG AGG AAC AGT GGG CAA GCA GCT AGC CGC GCT CGC CGC GCT GGT CGG
 met val pro ala gly arg asn ser gly gln ala ala ser arg ala arg arg ala gly arg
 241/81 271/91
 TGC GTG CAT GCT CGC AGC CGG ATG CAC CAA CGT GGT CGA CGG GAC CGC CGT GGC TGC CGA
 cys val his ala arg ser arg met his gln arg gly arg arg asp arg arg gly cys arg
 301/101
 CAA ATC CGG ACC ACT GCA TCA GGA TC
 gln ile arg thr thr ala ser gly

SEQ ID N° 20C'

FIGURE 20C'

séquence Rv3576 prédite par Cole et al. (Nature 393:537-544) et contenant seq20A'
 1/1 31/11
 atg ggc aag cag cta gcc gcg ctc gcc gcg ctg gtc ggt gcg tgc atg ctc gca gcc gga
 met gly lys gln leu ala ala leu ala ala leu val gly ala cys met leu ala ala gly
 61/21 91/31
 tgc acc aac gtg gtc gac ggg acc gcc gtg gct gcc gac aaa tcc gga cca ctg cat cag
 cys thr asn val val asp gly thr ala val ala ala asp lys ser gly pro leu his gln
 121/41 151/51
 gat ccg ata ccg gtt tca gcg ctt gaa ggg ctg ctt ctc gac ttg agc cag atc aat gcc
 asp pro ile pro val ser ala leu glu gly leu leu leu asp leu ser gln ile asn ala
 181/61 211/71
 gcg ctg ggt gcg aca tcg atg aag gtg tgg ttc aac gcc aag gca atg tgg gac tgg agc
 ala leu gly ala thr ser met lys val trp phe asn ala lys ala met trp asp trp ser
 241/81 271/91
 aag agc gtg gcc gac aag aat tgc ctg gct atc gac ggt cca gca cag gaa aag gtc tat
 lys ser val ala asp lys asn cys leu ala ile asp gly pro ala gln glu lys val tyr
 301/101 331/111
 gcc ggc acc ggg tgg acc gct atg cgc gcc caa cgg ctg gat gac agc atc gat gac tcc
 ala gly thr gly trp thr ala met arg gly gln arg leu asp asp ser ile asp asp ser
 361/121 391/131
 aag aaa cgc gac cac tac gcc att caa gcg gtc gtc ggc ttc ccg acc gca cat gat gcc
 lys lys arg asp his tyr ala ile gln ala val val gly phe pro thr ala his asp ala
 421/141 451/151
 gag gag ttc tac agc tcc tcg gtg caa agc tgg agc agc tgc tcg aac cgc cgg ttt gtc
 glu glu phe tyr ser ser ser val gln ser trp ser ser cys ser asn arg arg phe val
 481/161 511/171
 gaa gtc acc ccc gga cag gac gac gcc gcc tgg act gtg gct gac gtt gtc aac gac aac
 glu val thr pro gly gln asp asp ala ala trp thr val ala asp val val asn asp asn
 541/181 571/191
 ggc atg ctc agt agc tcg cag gtt cag gaa ggc gcc gac gga tgg acc tgc cag cgt gcc
 gly met leu ser ser ser gln val gln glu gly gly asp gly trp thr cys gln arg ala
 601/201 631/211
 ctg act gcg cgc aac aac gtc act atc gac att gtc acg tgc gcc tat agc caa ccg gat
 leu thr ala arg asn asn val thr ile asp ile val thr cys ala tyr ser gln pro asp
 661/221 691/231
 ttg gtg gcg att gcc atc gct aac caa atc gcg gcc aag gtt gct aag cag tag
 leu val ala ile gly ile ala asn gln ile ala ala lys val ala lys gln AMB

SEQ ID N° 20D

FIGURE 20D
 FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)